

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Endogene Systeme der Neuroprotektion:
Charakterisierung von Melatonin und
17 β -Estradiol in neuronalen
Primärkulturen der Ratte**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Christoph Friedemann Harms
aus Detmold

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Klaus B. Fink, Universität Bonn
2. Prof. Dr. Heide Hörtnagl, Humboldt-Universität zu Berlin
3. Prof. Dr. Günther Sperk, Universität Innsbruck

Datum der Promotion: 23.6.2003

Für Ulrike Susanne, Richard Jonathan und meine grosse, liebe Familie.

1	Einleitung.....	6
1.1	Untergang neuronaler Zellen: Apoptose und Nekrose	6
1.2	Endogene Systeme der Neuroprotektion	11
1.2.1	Melatonin als neuroprotektive Substanz.....	12
1.2.2	Estradiol als neuroprotektive Substanz	15
1.3	Modelle der Zelldegeneration <i>in vitro</i>	18
2	Aufgabenstellung.....	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Primäre, neuronale Zellkulturen	21
3.2	Modelle der Zellschädigung	23
3.2.1	Ethylcholin-Aziridiniumion (AF64A)	23
3.2.2	Staurosporin.....	23
3.2.3.	Kombinierter Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD).....	24
3.2.3	OGD mit Blockade der exzitotoxischen Komponente mittels des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonisten (NMDA) MK801	24
3.2.4	Glutamat.....	24
3.3	Vorbereitung der Zellkulturen, Versuchsaufbau und pharma-kologische Interventionen	25
3.4	Evaluierung der Zellschädigung	26
3.4.1	Phasenkontrastmikroskopie	27
3.4.2	Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätsmessung	28
3.4.3	Thiazolylblau (MTT)-Metabolismus	29
3.4.4	Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase-mediertes dUTP Nick-End Labeling und Zellzählung	29
3.4.5	DNS-Isolation und Gelektrophorese.....	30
3.4.6	α -Fodrin-Spaltprodukte (Westernblot-Analyse).....	31
3.5	Westernblots	31
3.5.1	Ernten der Zellen und Zelllyse.....	31
3.5.2	Proteinquantifizierung (BCA-Assay).....	32
3.5.3	Gelektrophorese, Blotting und Visualisierung der Banden	32
3.5.4	Semiquantitative Analyse der Bandendichten	33
3.6	Immunzytochemie	33
3.6.1	Immunzytochemie zum Nachweis cholinerges Neurone.....	33
3.6.2	Immunzytochemie zum Nachweis von Estrogenrezeptor- α und - β	33
3.6.3	Konfokale Mikroskopie	34
3.6.4	Quantifizierung der Ergebnisse	34
3.7	Messung der Lipidperoxidation	35
3.8	Statistik.....	35
3.9	Materialien.....	36
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Charakterisierung des AF64A-Schadensmodells.....	38
4.1.1	Selektiver Zelltod cholinerges Neurone in septalen Kulturen bei niedriger AF64A-Dosis	38
4.1.2	Kinetik des LDH-Anstiegs und der Reduktion des MTT-Metabolismus nach AF64A-Behandlung	39
4.1.3	Phasenkontrastmikroskopie AF64A-behandelter Kulturen im Zeit-verlauf	40
4.1.4	Oligonukleosomale DNS-Fragmentierung nach AF64A-Behandlung	41
4.1.5	AF64A-Toxizität und der unspezifische Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK.....	42

4.2	Unterscheidung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod	43
4.2.1	Morphologische Charakterisierung mit Phasenkontrastmikroskopie: Vergleich von Apoptose und Nekrose	43
4.2.2	TUNEL-Färbung	44
4.2.3	Analyse der α -Fodrin-spaltprodukte	45
4.3	Effekte von Melatonin in den unterschiedlichen Schadensmodellen	46
4.3.1	Eigenwirkung von Melatonin in nativen, neuronalen Primärkulturen	46
4.3.2	AF64A und Melatonin	49
4.3.2.1	AF64A und andere antioxidative Substanzen	51
4.3.3	Staurosporin und Melatonin	52
4.3.3.1	Staurosporin und andere antioxidative Substanzen	53
4.3.4	OGD und Melatonin	54
4.3.5	OGD mit MK-801 und Melatonin	55
4.4	Effekt von 17 β -Estradiol in den unterschiedlichen Schadensmodellen	57
4.4.1	AF64A und 17 β -Estradiol	57
4.4.2	Staurosporin und 17 β -Estradiol	61
4.4.3	Glutamat und 17 β -Estradiol	61
4.4.4	OGD und 17 β -Estradiol	64
4.5	Rezeptor-abhängige und unabhängige neuroprotektive Wirkungen von 17 β -Estradiol	65
4.6	Modulation der Expression von Bcl-2, Bcl-x _L und Bax durch 17 β - Estradiol in hippokampalen und kortikalen Kulturen	66
4.7	Expression von Estrogenrezeptor- α und - β in septalen, hippokampalen und kortikalen Kulturen	69
4.7.1	Immunzytochemischer Nachweis von Estrogenrezeptor- α	69
4.7.2	Immunzytochemischer Nachweis von Estrogenrezeptor- β	69
4.8	Beteiligung der Phospho-Inositol-3-Kinase (PI-3-Kinase)-Kaskade an der zellschützenden Wirkung von 17 β -Estradiol	72
4.9	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die Arbeits-hypothesen bzw. Fragestellungen	73
5	Diskussion	74
5.1	Melatonin	74
5.2	17 β -Estradiol	79
6	Zusammenfassung und Ausblick	85
7	Literatur	87
	Abkürzungsverzeichnis	98
	Danksagung	99
	Eidesstattliche Erklärung	100

1 Einleitung

1.1 Untergang neuronaler Zellen: Apoptose und Nekrose

Der neuronale Zelltod lässt sich in zwei sehr unterschiedliche Formen unterteilen, die Apoptose oder programmierter Zelltod, und die Nekrose. Schon früh wurde das Konzept des Zelltods in der Pathologie besonders im Kontext verschiedener Krankheiten etabliert (Virchow, 1858). Es wurde beobachtet, dass zugrundegehende Zellen deutliche morphologische Unterschiede aufwiesen, die man in Zusammenhang mit unterschiedlichen Ursachen des Zelltodes brachte. So unterschied man zunächst den physiologischen vom pathologischen Zelltod (Glücksman, 1951). Basierend auf morphologischen und biochemischen Unterschieden erfolgte die Klassifikation in Apoptose und Nekrose (Kerr et al., 1971, 1972; Wyllie, 1980; Gerschenson et al., 1992).

Apoptose ist die wesentliche Form des physiologischen Zelltods im Zentralnervensystem. Während der Ontogenese des Gehirns sterben bis zur adulten Hirnreife 20 - 80% der Neuronen durch Apoptose (Oppenheim, 1991). Auch zu späteren Zeitpunkten wird Apoptose als aktiver zellulärer Suizid induziert, um Zellen zu entfernen, die beispielsweise durch mutagene Einflüsse ihre physiologische Funktion nicht erfüllen können, tumorös entarten (Williams, 1991) oder mit Viren infiziert sind (Vaux et al., 1994). Ausserhalb des ZNS werden auch autoaggressive Lymphozyten durch die Induktion des programmierten Zelltods eliminiert, so dass sie nicht für den Organismus gefährlich werden können (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991; Tsubata et al., 1994). Daher wird Apoptose in verschiedenen Geweben generell genutzt, um Zellen zu vernichten ohne systemische Entzündungskaskaden mit daraus resultierenden Gewebsuntergängen auszulösen. Neben der physiologischen Rolle der Apoptose ergaben sich jedoch immer mehr Hinweise für eine Beteiligung der Apoptose bei pathologischen Prozessen im ZNS (Thompson, 1995).

Nekrose tritt immer dann auf, wenn eine Zelle extremem physikalischen Stress oder starken chemischen Reizen ausgesetzt ist und eine kontrollierte Reparatur des Schadens z.B. aufgrund eines Energiemangels nicht möglich ist oder die Zellhomöostase nicht aufrecht erhalten werden kann (Wang, 2000).

Eine Beteiligung der Apoptose wurde zunächst nur bei langsam-progressiven neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer'schen Krankheit, der Amyotrophen Lateralsklerose oder der Parkinsonschen Krankheit angenommen (Lassmann et al., 1995; Thompson, 1995; Mochizuki et al., 1996).

Bei neurologischen Erkrankungen, wie der zerebralen Ischämie, der traumatischen Hirnschädigung oder der Rückenmarksverletzung galt der nekrotische Zelltod als einzige Form des Zelluntergangs, bis erste Hinweise für apoptotische Charakteristika in einem *in vivo*-Modell für fokale Ischämie in der Ratte präsentiert (Linnik et al., 1993) und inzwischen durch viele Arbeiten ergänzt wurden (MacManus et al., 1993; Filipkowski et al., 1994; Namura et al., 1998; Fink et al., 1998; Endres et al., 1998; Chen et al., 1998). Derzeit finden sich bei neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen immer mehr Hinweise für das gleichzeitige Vorkommen sowohl von Apoptose als auch Nekrose (Martin et al., 1998; Nicotera et al., 1999).

Der Begriff Apoptose wurde von Kerr und seinen Mitarbeitern 1972 eingeführt und beschreibt charakteristische morphologische Veränderungen dieser Todesform (Kerr et al., 1972). Zu diesen Veränderungen zählen das Schrumpfen des Zytoplasmas, die Bläschenbildung („blebbing“) an den Zellmembranen und die halbmondförmige, nukleäre Chromatin-Kondensation und auch Veränderungen der Zellmembranoberfläche, auf der Phosphatidyl-Serin exponiert wird, ein Molekül, das sonst im Inneren der Zelle zu finden ist (Kerr et al., 1972; Fadok et al., 1992; Vanags et al., 1996). Durch enzymatische Spaltung wird die DNS zunächst in grosse Stücke (50kb) und später auch kleine (oligonukleosomale) Fragmente von circa 180 Basen Länge gespalten (Walker et al., 1993; Oberhammer et al., 1993; Majno und Joris, 1995; Wyllie, 1980). Schließlich werden Zellkern und die Organellen in apoptotische Körper aufgeteilt und in Zellmembranen verpackt. Das sind mehr oder weniger runde Elemente, die Chromatin enthalten und der schnellen Phagozytose durch Makrophagen und anderen Zellen mit phagozytischer Aktivität zugeführt werden.

Im Gegensatz dazu stellt sich die Nekrose in der Folge „katastrophaler Ereignisse“ nach extremem physischen oder toxischen Stress morphologisch in Form passiver, schneller Beschädigung zytosolischer Organellen wie der Mitochondrien mit frühzeitiger Energiedepletion, dem Zusammenbruch der internen Homöostase mit anschließender Lyse der Zelle, Freisetzung des zellulären Inhalts und konsekutiver Inflammation dar. Durch diese Vorgänge werden charakteristischerweise auch be-

nachbarte Zellen geschädigt (Kerr and Harmon, 1991; Schwartz et al., 1993; Savill et al., 1993).

Eine Reihe biochemischer Eigenschaften erlauben eine Unterscheidung der beiden Todesarten. Zur Aufklärung der biochemischen Abläufe der Apoptose ist es besonders hilfreich gewesen, dass dieser Prozeß in der Evolution früh auftrat und hochkonserviert wurde. Tatsächlich basiert ein Großteil unseres Wissens auf Erkenntnissen aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Ellis et al., 1991; Hengartner und Horvitz, 1994). Hier sind insgesamt 14 Gene beschrieben worden, die in drei verschiedene Gruppen von Genen eingeteilt werden können, die folgende Aufgaben haben: direkte Exekution der Apoptose, Vermittlung der Phagozytose apoptotischer Zellen, und Gene mit regulierender pro- und antiapoptotischer Funktion. Diese drei Gruppen sind zu den wichtigsten Genen in Säugetierzellen größtenteils strukturell homolog. Dabei sind die Caspasen aus der Familie der konservierten Aspartat-spezifischen Cysteinylnproteasen die Säugetierhomologe für die Proteasen CED-3 in *Caenorhabditis elegans*. Es spielen aber auch antiapoptotische Gene wie Bcl-2 (Strukturhomologie zu CED-9), Bcl-x_L oder proapoptotische Gene wie Bax eine zentrale Rolle. Diese sind auch im Nematoden nachweisbar und zunächst dort beschrieben worden (Steller, 1995).

In Säugetierzellen liessen sich bisher 14 unterschiedliche Caspasen charakterisieren. Diese Proteasen sind im Zytosol konstitutiv vorhanden und sind an der Endstrecke der Apoptose wesentlich beteiligt (Slee et al., 2001). Durch apoptogene Signale werden sie durch Proteolyse aus einer Pro-Caspase-Form aktiviert und aktivieren so ihrerseits zahlreiche Enzyme, die als Substrat fungieren und die morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle wie Chromatinkondensation, nukleäre Fragmentation und Phosphatidyl-Serinexposition auslösen. Zu diesen Substraten der Caspasen gehören zum Beispiel die Poly-ADP-Ribosyltransferase, α -Fodrin, Gelsolin, und wichtige Enzyme für die Reparatur der Desoxyribonucleinsäure (DNS; Kothakota et al., 1997; Wang, 2000). Die Aktivierung der Caspasen liegt in der Kaskade vor der DNS-Degradation in Fragmente, aber oberhalb von initialen apoptogenen Stimuli, die nach heutigen Vorstellungen auf drei unterschiedlichen Wegen die Exekution der Apoptose initiieren können.

Auslöser der Caspaseaktivierung sind die Cytochrom-C und/oder AIF (apoptosis inducing factor)-Freisetzung aus den Mitochondrien, Stimulation von sogenannten Todesrezeptoren auf der Oberfläche der Zellen und neuerdings ein dritter Weg über

das endoplasmatische Retikulum mit Calciumfreisetzung und Aktivierung von Caspase 12 (Nakagawa et al., 2000; Mehmet, 2000; Yoneda et al., 2001; Rao et al., 2001). Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der drei bisher bekannten Apoptosewege:

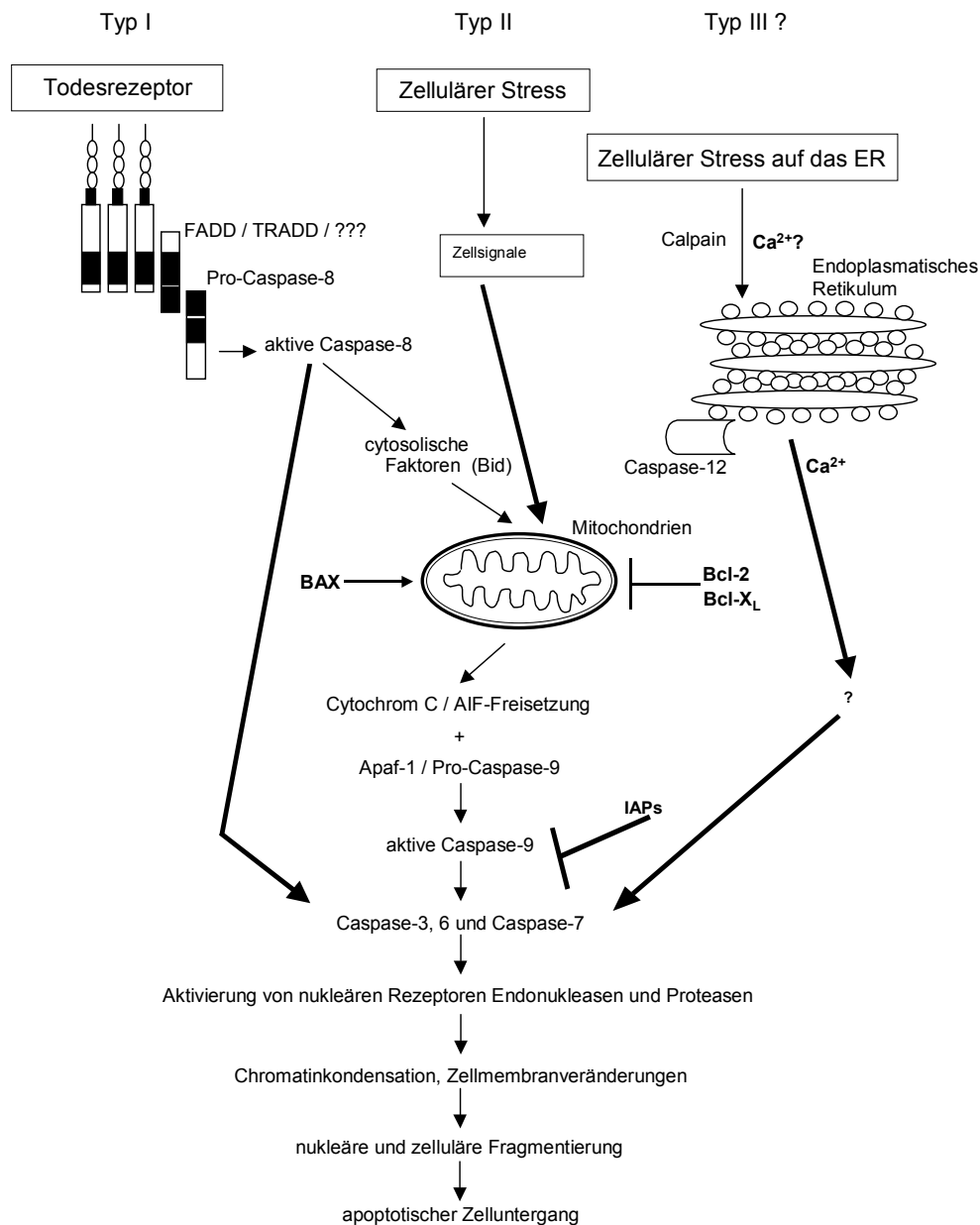


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Apoptosewege mit den wichtigen pro- und antiapoptotischen Modulatoren. Bei der neuronalen Apoptose scheint Typ II-Apoptose zu dominieren. Die skizzierte Kaskade der Typ III-Apoptose ist nach Mehmet noch nicht vollständig bekannt (Mehmet, 2000).

Eine weitere wichtige Beobachtung ist der Einfluss des Zellzyklus auf den Ablauf der Apoptose in postmitotischen neuronalen Zellen (Park et al., 1996, 1997; Busser et al., 1998; Osuga et al., 2000; Katchanov and Harms et al., 2001; Harms and Katchanov et al., manuscript submitted). Eine Zellzyklusaktivierung bis zur G1/S-Phase wurde in verschiedenen Modellen der neuronalen Apoptose nachgewiesen (Park et al., 1998).

Die Unterscheidung der beiden Todesformen hat in den letzten Jahren an Klarheit verloren, da Apoptose und Nekrose als „Extremformen“ des Zelluntergangs mit vielen Zwischenformen entlang eines „apoptotisch-nekrotischen Kontinuums“ verstanden werden müssen (Bonfoco et al., 1995; Martin et al., 1998). Es lässt sich bisher auch noch nicht ausschließen, ob nicht weitere Wege des Zelluntergangs entdeckt werden, die Charakteristika beider Todesarten gemeinsam aufweisen und als Apoptose-ähnlich beschrieben werden (Wang, 2000; Leist und Jäätelä, 2001). Abbildung 2 gibt die Abhängigkeit der Todesart von der Intensität bzw. der Dosis eines Zellstressors wieder:

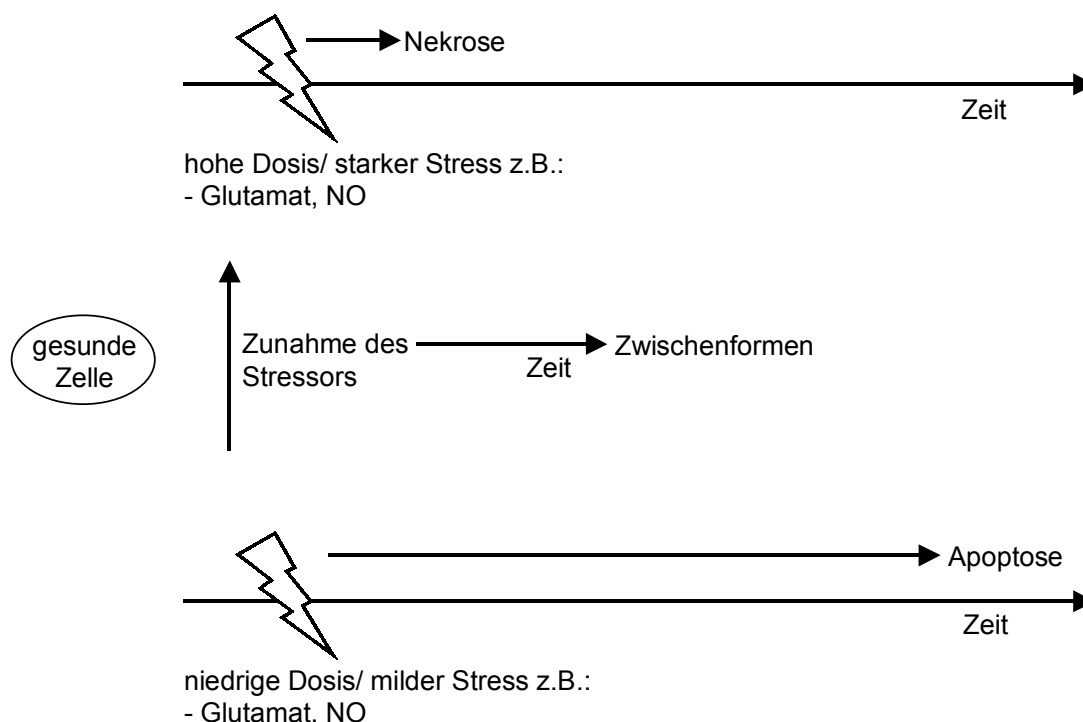


Abb. 2: Eine gesunde Zelle geht entlang eines apoptotisch-nekrotischen Kontinuums in Abhängigkeit von der Dosis oder der Intensität des Zellstress in Form der Apoptose, Zwischenformen oder Nekrose zugrunde (nach Modellvorstellung von Bonfoco et al., 1995 und Martin et al., 1998).

Inwieweit die Qualität und Quantität der Form des Zelluntergangs Auswirkungen auf den Verlauf und die Geschwindigkeit pathophysiologischer Erkrankungen des

ZNS haben, ist noch unklar. Jedoch trägt das wachsende Wissen über die Mechanismen, die zu apoptotischem oder nekrotischem Zelluntergang führen zu einem besseren Verständnis der pathogenetischen Prozesse im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen bei. Es eröffnet neue Wege für therapeutische Strategien zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen. Die zunehmende Häufung neurodegenerativer Erkrankungen -z.B. rangiert die Alzheimer'sche Erkrankung als vierthäufigste Todesursache der westlichen Welt- erfordert eine hohe Priorität für die Entwicklung effektiver therapeutischer Maßnahmen. Bei der Suche nach neuen neuroprotektiven Strategien könnte die Berücksichtigung endogener Mechanismen einen wichtigen Stellenwert einnehmen.

1.2 Endogene Systeme der Neuroprotektion

In den letzten Jahren sind eine Reihe von endogenen Mechanismen oder Substanzen erkannt worden, die eine neuroprotektive bzw. antiapoptotische Wirkung vermitteln und / oder in den Ablauf der Apoptose regulierend eingreifen. Diese Substanzen können intrazellulär vorliegen, wie z.B. Vertreter der Bcl-Familie oder der IAP-Familie, oder auch von extrazellulär an die Zelle gelangen, wie z.B. Erythropoietin und antiinflammatorische Zytokine. Antiapoptotische Gene der Bcl-Familie und die IAPs (Inhibitoren der Apoptose) greifen an unterschiedlichen Stellen in die apoptotische Kaskade ein und schützen so vor dem Zelluntergang (Adams and Cory, 1998; Deveraux and Reed, 1999). Erythropoietin ist ein Beispiel für eine endogene neuroprotektive Substanz, die auch bei der stress-induzierten Präkonditionierung möglicherweise therapeutische Bedeutung erlangen könnte (Sakanaka et al., 1998; Brines et al., 2000; Digicaylioglu and Lipton, 2001; Dawson, 2002). Ob physiologische Konzentrationen ausreichen, um endogene Neuroprotektion durch Erythropoietin zu vermitteln, bleibt aber noch unklar (Dawson, 2002). Entscheidend für die Wirkung von Erythropoietin sind bisher die Applikation von Erythropoietin vor Beginn der Schädigung oder die intravenöse Gabe während der Reperfusion bei ischämischer Schädigung und die Gabe supraphysiologischer Konzentrationen (Dawson, 2002; Celik et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für endogene Mechanismen der Neuroprotektion sind die endogenen Cannabinoide 2-Arachidonoyl-Glycerol und Anandamid, die bei geschlossenem Hirntrauma *in vivo*, exzitotoxischer Schädigung hippokampa-

ler Neurone *in vitro* und *in vivo* und Schädigung kortikaler Neurone durch OGD *in vitro* neuroprotektiv wirkten (Panikashvili et al., 2001; Mechoulam et al., 2002).

Besonders hervorzuheben sind die beiden Hormone Melatonin und 17 β -Estradiol, die bereits Eingang in therapeutische Prinzipien bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen gefunden haben. Das neuroprotektive Potential dieser Hormone wurde experimentell *in vitro* und *in vivo* demonstriert. Die Wirkungsweisen, mögliche Einschränkungen und ihr Potential bei unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen des ZNS sind jedoch noch weitgehend unverstanden.

1.2.1 Melatonin als neuroprotektive Substanz

Melatonin ist das Hauptprodukt der Zirbeldrüse (Glandula pinealis), bestimmt maßgeblich die circadianen Rhythmen und weist viele Wechselbeziehungen mit dem neuroendokrinen System auf (Reiter et al., 1995). Auf diese physiologischen Eigenschaften wird in dieser Studie nicht weiter eingegangen, da sie für die *in vitro*-Untersuchungen von geringer Relevanz sind. Die neuroprotektiven Eigenschaften von Melatonin erklären sich zum großen Teil über seine antioxidativen Eigenschaften. Melatonin wird als ausserordentlich potenter, antioxidativer Radikalfänger im Konzentrationsbereich 10^{-6} beschrieben (Reiter, 1998; Pappolla et al., 1997). Daher möchte ich im folgenden Abschnitt näher auf die Funktionsweise als Antioxidans eingehen.

Melatonin soll mittels Elektronenabgabe direkt freie Radikale einfangen und auf diese Weise entgiften (Reiter et al., 1995, 1997; Reiter, 1998). Diese Radikale entstehen meistens aus dem Sauerstoffmolekül und werden in aerob lebenden Organismen ständig gebildet. So können Superoxidradikale ($O_2\text{---}\bullet$), das Hydroxylradikal ($\bullet OH$) und Stickstoffmonoxid (NO) entstehen. Freie Radikale sind hochreaktive chemische Strukturen, die mit organischen Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen oder DNS reagieren können und dadurch funktionelle Störungen auslösen. Diese Form der oxidativen Schädigung ist ein wichtiger Faktor in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen, einschließlich von Gehirnerkrankungen. Durch das Abfangen dieser gewebsschädigenden Radikale könnten daher Krankheitsprozesse verlangsamt oder verhindert werden. Abb. 3 zeigt einen Vorschlag von Reiter, wie Melatonin ein Hydroxylradikal mittels Elektronenabgabe entgiften kann (Reiter et al., 1997):

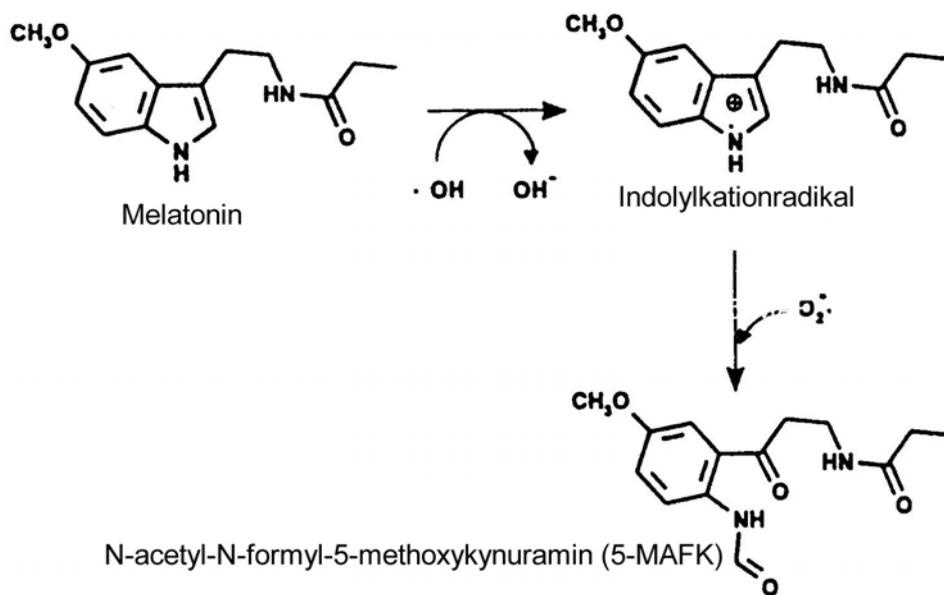


Abb. 3: Bei der Wechselwirkung von einem Radikal (hier das Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}$ mit einem Nichtradikal (hier Melatonin) muss ein Radikal entstehen, das Indolyl-Kationradikal. Dieses Zwischenprodukt kann dann zum Beispiel das Superoxidation-Radikal entfernen, so dass N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramin (5-MAFK) entsteht.

Melatonin ist auch in der Lage, das Peroxylradikal ($\text{LOO}\cdot$) zu entfernen, das bei der Lipidperoxidation eine Kettenreaktion mit der Folge der ausgeprägten Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auslöst. Auch Vitamin E kann diese Kettenreaktion unterbrechen und trägt so zur Erhaltung der Membranintegrität und damit zum Erhalt der Zellfunktion bei (Reiter et al., 1997).

Die neuroprotektive Wirkung von Melatonin wurde vorwiegend in neuronalen Schadensmodellen gezeigt, in denen freie Radikale aus Sauerstoff beteiligt waren und exzitotoxische Aminosäuren und Toxine eingesetzt wurden. In den beiden Parkinsonmodellen, in denen mit N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) oder 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) dopaminerge Neurone geschädigt werden, war Melatonin in der Lage, den Anstieg der Produkte der Lipidperoxidation und den Abfall der Tyrosinhydroxylase im Striatum und der Substantia nigra zu verhindern und rettete dopaminerge Zellen in Kultur vor dem Zelluntergang (Acuna-Castroviejo et al., 1997; Iacovitti et al., 1997; Jin et al., 1998; Kim et al., 1998). Melatonin verhinderte auch den durch das exzitotoxisch wirkende Kainat entstandenen neuronalen Zellverlust und reduzierte die Lipidperoxidationsprodukte in Ratten und Mäusen *in vivo* (Melchiorri et al., 1995; Giusti et al., 1996; Tan et al., 1998). Melatonin schützte die klonierte hippokampale Zelllinie HT22 vor Glutamattoxizität (Lezoualc'h et al., 1996) und verhinderte den verzögerten Zelltod, der in hippokampalen Pyramidenzellen in Zellkultur

durch verstärkte, erregende synaptische Übertragung ausgelöst wurde (Skaper et al., 1998). Neuroblastomazellen, die mit β -Amyloid, dem bei der Alzheimer'schen Erkrankung akkumulierten toxischen Fragment des β -Amyloid-Precursorproteins behandelt wurden, konnten durch Melatonin erhalten werden (Pappolla et al., 1997).

Eine antikonvulsive Wirkung von Melatonin konnte in verschiedenen Epilepsiemodellen gezeigt werden, wie bei Quinolinat-, Kainat- und Glutamat-induzierten Schädigungen in Mäusen sowie bei durch Eisen- und Amygdala-kindling verursachte Schädigungen in Ratten (Lapin et al., 1998; Kabuto et al., 1998; Mevissen und Ebert, 1998; Southgate et al., 1998). Melatonindefizit führte in Ratten nach Schlaganfall und exzitotoxischen Läsionen zu größerer Schädigung des Gehirns und bestätigten die antioxidative Wirkung des Melatonins (Manev et al., 1996).

Neben dem antioxidativen Potential des Melatonins sind eine Reihe von anderen neuroprotektiven Mechanismen diskutiert worden. Dazu gehörten Interaktionen mit Calmodulin (Benitez-King und Anton-Tay, 1993; Huerto-Delgadillo et al., 1994) und mikrotubulären Komponenten (Huerto-Delgadillo et al., 1994), die Blockade des Anstiegs intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel (Pappolla et al., 1997), die Erhaltung der zellulären Glutathionhomöostase (Floreani et al., 1997; Dabbeni-Sala et al., 2001), die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B (Nukleärer Faktor kappa B) durch Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (Mohan et al., 1995), Hemmung der Expression der induzierbaren NO-Synthase auf Transkriptionsebene (Gilad et al., 1998) und die Veränderungen der Genexpression antioxidativer Enzyme (Antolin et al., 1996).

Über eine mögliche Beteiligung des Melatonins bei der Alzheimer'schen Erkrankung wurde spekuliert, da die physiologischen Melatoninspiegel im Alter abnehmen, bei Patienten mit der Alzheimer'schen Erkrankung jedoch im Vergleich zum gleichen Alterskollektiv gesunder Probanden zusätzlich vermindert sind (Übersicht bei Cardinali et al., 2002). In den ersten, an sehr kleinen Patientenkollektiven durchgeführten, klinischen Studien zur Wirkung von Melatonin bei Patienten mit der Alzheimer'schen Erkrankung wurden erste Hinweise für eine Verlangsamung der Progression der Erkrankung unter Melatoninbehandlung (9 mg Melatonin pro Tag für 22 – 35 Monate) gefunden (Brusco et al., 1998; 2000; Cardinali et al., 2002).

1.2.2 Estradiol als neuroprotektive Substanz

Das Steroidhormon Estrogen spielt eine essentielle Rolle im Wachstum, Differenzierung und Funktion der peripheren Gewebe des Reproduktionssystems. Daneben beeinflusst dieses Hormon auch die Knochenhomöostase und das kardiovaskuläre System, in dem es auch kardioprotektive Wirkungen vermittelt (Übersichtsarbeit bei Kuiper et al., 1998). Von besonderem Interesse ist, dass Estrogen auch im Zentralnervensystem, in dem sowohl der Estrogenrezeptor- α als auch der erst 1995 entdeckte Estrogenrezeptor- β ubiquitär exprimiert sind, diverse neuronale Funktionen, einschließlich Lern- und Gedächtnisprozesse, beeinflusst. Die Verteilung der Estrogenrezeptoren im Gehirn ist geschlechtsunspezifisch (Kuiper et al., 1997; 1998).

Eine Reihe von epidemiologischen Studien assoziierten die Substitutionstherapie mit Estrogenen in der Menopause mit einem verminderten Risiko für das Auftreten der Alzheimer'schen Erkrankung und des M. Parkinson (Paganini-Hill und Henderson; 1994; Robinson et al., 1994; Sherwin, 1994; Birge, 1996; Tang et al., 1996; Yaffe et al., 1998; Costa et al., 1999; Saunders-Pullman et al., 1999). So konnten z.B. Tang und Mitarbeiter (1996) in einer Longitudinalstudie über 1 – 5 Jahren an 1120 Frauen zeigen, dass abhängig von der Dauer der Estrogensubstitution eine Verminderung des Risikos an Morbus Alzheimer zu erkranken, zu beobachten war (Risiko 5.8% bei Estrogenbehandlung versus 16.3% ohne Estrogenbehandlung). Insgesamt sind die günstigen Wirkungen auf die Kognition jedoch als marginal zu bewerten (siehe Metastudie Yaffe et al., 1998). Günstige Effekte von Estrogen auf die Mortalität und Morbidität wurden hingegen bei zerebraler Ischämie demonstriert (Lafferty and Fiske, 1994; Grodstein et al., 1996; Hurn and MacRae, 2000).

Die epidemiologischen Hinweise auf die Verminderung des Risikos des Auftretens der Alzheimer'schen Erkrankung ließen auch therapeutische Erfolge bei Manifestation der Erkrankung erwarten. Die erste prospektive, doppelblinde, randomisierte, placebo-kontrollierte Studie mit einer ausreichend hohen Zahl von Patienten mit milder oder mittelgradiger Alzheimer'scher Erkrankung wurde im Februar 2000 veröffentlicht. Der Erfolg einer Estrogensubstitutionstherapie wurde an insgesamt 120 Patienten über ein Jahr getestet. Es wurden jedoch weder Hinweise für eine Verbesserung der Kognition und funktioneller Veränderungen gefunden, noch wurde die Progression der Alzheimer'schen Erkrankung verlangsamt (Mulnard et al., 2000). Ähn-

lich negative Befunde wurden in einer 12-Wochen-Studie an 50 Patienten mit Alzheimer'scher Erkrankung erhoben (Wang et al., 2000). In Summe weisen die vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass eine Estrogensubstitutionstherapie zwar möglicherweise in der Lage ist, das Risiko für das Auftreten einer Alzheimer'schen Erkrankung herabzusetzen, jedoch bei bereits manifester Erkrankung ineffektiv bleibt.

Diese klinischen Befunde könnten nach einer Hypothese von Hogervorst und Smith auf mögliche Interaktionen von Estrogenen mit Faktoren zurückgeführt werden, die mit der Alzheimer'schen Erkrankung assoziiert sind (Hogervorst und Smith, 2002). Im Rahmen des „Oxford project to investigate memory and ageing“ zeigte sich an 66 Frauen mit Alzheimer'scher Erkrankung und Kontrollgruppe eine Assoziation der Krankheit mit einer erhöhten Ratio von Estradiol zur Gesamtmenge aller Estrogene (Estradiol + Estron), so dass in einer schrittweisen logistischen Regressionsanalyse im Vergleich zur Kontrollgruppe diese Ratio als Prädiktor für die Erkrankung eruiert werden konnte (Odds Ratio: 1,06; 95%-Confidenzintervall: 1,01 – 1,11; $p < 0,01$). In einer multiplen Regressionsanalyse zeigte sich, dass die Schwere der Demenz mit einer Interaktion zwischen der hohen Ratio von Estradiol zur Gesamt-estrogenmenge und dem Serumfolatspiegel assoziiert war. Die Erkrankung war also mit einer hohen Estrogenratio assoziiert, jedoch war in Individuen mit einer hohen Ratio die Schwere der Demenz niedriger bei denjenigen mit hohen Serumfolatspiegeln. Die Autoren folgern, dass bei kausalem Zusammenhang der Faktoren, eine Estrogensubstitutionstherapie in Kombination mit Folat-Substitution möglicherweise erfolgversprechend sein könnte (Hogervorst und Smith, 2002). Andere mögliche Ursachen für den fehlenden Therapieerfolg der Estrogensubstitutionstherapie werden in der folgenden Untersuchung angesprochen.

Die neuroprotektive Wirksamkeit von Estrogenen wurde inzwischen experimentell in verschiedenen Modellen der Neurodegeneration und ischämischen Schädigung *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen. In ovariectomierten Ratten verkleinerte Estradiol das Ausmaß der Hirnschädigung nach zerebraler Ischämie (Dubal et al., 1998). Aber auch in nicht mehr reproduktionsfähigen alten weiblichen Ratten schützte Estradiol vor ischämischer Schädigung (Alkayed et al., 2000). In primären neuronalen Kulturen, in organotypischen hippokampalen Kulturen und in der hippokampalen Zelllinie HT22 verkleinerte Estradiol die neuronale Schädigung in Reaktion auf Hypoxie, Exzitotoxine, Superoxidanionen und H_2O_2 (Goodman et al., 1996; Singer et

al., 1996; Behl et al., 1997; Regan und Guo, 1997; Weaver et al., 1997; Sawada et al., 1998). Darüberhinaus reduziert Estradiol die neurotoxischen Wirkungen von β -Amyloid sowie die Bildung von β -Amyloid in Zellkulturen (Gridley et al., 1997; Keller et al., 1997; Mook-Jung et al., 1997; Bonnefont et al., 1998; Xu et al., 1998; Pike, 1999). In transgenen Mausmodellen der Amyloidose entwickelten ovariectomierte Mäuse mit Estradioldefizienz höhere Spiegel von β -Amyloid und diese Akkumulation von β -Amyloid in senilen Plaques des Gehirns konnte in den ovariectomierten Mäusen durch Substitution von Estradiol verhindert werden (Zheng et al., 2002). Die Überexpression von β -Amyloid-Precursorprotein-mRNA nach fokaler Ischämie in weiblichen ovariectomierten Ratten wurde durch eine einzige subkutane Injektion von 17 β -Estradiol (100 μ g / kg) 2 h vor Okklusion der Arteria cerebri media vermindert (Shi et al., 1998).

Als Mechanismen für die neuroprotektive Wirkung der weiblichen Sexualhormone werden sowohl genomisch als auch nicht-genomisch vermittelte Effekte beschrieben (Übersichtsarbeiten von Behl und Holsboer, 1999; Lee und McEwen, 2001; Behl, 2002). Für die von Estrogenrezeptoren unabhängigen Wirkungen spielen sowohl direkte antioxidative Eigenschaften als auch eine Interaktion an möglichen Bindungsstellen an der neuronalen Membran (Membranrezeptoren) eine Rolle (Behl und Holsboer, 1999). Über derartige Membranrezeptoren könnten die Neurotransmission und Erregbarkeit der neuronalen Membran moduliert werden (Bicknell, 1998; Gu et al., 1999). Die über die klassischen Estrogenrezeptoren- α und β -vermittelten Effekte auf die neuronale Gentranskription führen zum Auswachsen von Neuriten, Synaptogenese, Expression von neurotrophischen Faktoren und erhöhter Synthese von Acetylcholin.

Die klassischen Estrogenrezeptoren α und β weisen im Zentralnervensystem sowohl eine unterschiedliche Verteilung als auch unterschiedliche Regulation auf (Shughrue et al., 1997; Laflamme et al., 1998). Im zerebralen Kortex der Ratte ist die Estrogenrezeptor- α -mRNA nicht oder in wenigen Zellen der Lamina IV – V nur schwach nachweisbar, während die Estrogenrezeptor- β -mRNA in vielen Zellen verteilt über die Laminae IV – VI des Isokortex detektierbar ist (Shughrue et al., 1997; Laflamme et al., 1998). Der Estrogenrezeptor- α ist auch in kultivierten Neuronen des embryonalen Rattenkortex (E14) kaum exprimiert (Zhang et al., 2000). Beide Estrogenrezeptortypen weisen zwar die gleiche Affinität für das endogene Estrogen 17 β -

Estradiol auf (Kuiper et al., 1997), jedoch besitzen beide Rezeptorformen unterschiedliche Affinitäten für die „Estrogen-Response-Elemente“ und zeigen somit ein unterschiedliches, teilweise konträres Muster der Genaktivierung (Hyder et al., 1999). Für die neuroprotektive, antiapoptotische Wirkung kommen insbesondere zwei Transkriptionseffekte, die ausschließlich über den Estrogenrezeptor- α vermittelt werden, in Frage. Erstens führt der aktivierte Estrogenrezeptor- α zu einer raschen Aktivierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptorwegs [Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor pathway] und der damit verbundenen Signal-Kaskade (Kahlert et al., 2000). IGF-1 stellt einen wichtigen Faktor für das Überleben von Neuronen dar. Zweitens gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Estrogenrezeptor- α und der unter 17 β -Estradiol auftretenden erhöhten Expression von Bcl-x_L (Pike, 1999). Konträre Effekte beider Rezeptorformen wurden hinsichtlich der Regulation des AP1-Elements und der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun beschrieben. Estrogenrezeptor- α vermittelt eine Aktivierung der Transkription, während Estrogenrezeptor- β die Transkription am AP1-Element inhibiert (Paech et al., 1997).

1.3 Modelle der Zelldegeneration *in vitro*

Zum Nachweis einer neuroprotektiven Wirkung einer Substanz stehen eine Reihe von *in vitro*-Modellen der Neurodegeneration zur Verfügung. In der vorliegenden Untersuchung wurden als Neurodegenerationsmodelle mit vorwiegend nekrotischem, neuronalem Schaden der Glutamat-induzierte Untergang der neuronalen Zellen und der Sauerstoff-Glukose-Entzug (oxygen-glucose deprivation; OGD) verwendet. Die OGD wurde als Modell für exzitotoxisch und durch oxidativen Stress ausgelösten Schaden gewählt. Von einem protektiven Effekt durch Behandlung mit Melatonin gegen Hypoxie bzw. Reoxygenierung in primären, kortikalen Neuronenkulturen der Ratte (Cazevieille et al., 1997) und gegen transiente Vorderhirnischämie in Ratten (Cho et al., 1997) wurde berichtet. Zur Auslösung einer neuronalen Apoptose wurden drei verschiedene Exzitotoxin-unabhängige Degenerationsmodelle ausgewählt. Als ein Standardapoptosemodell wurde Staurosporin eingesetzt, ein Mykotoxin, von dem bekannt ist, dass es virtuell in allen Zellarten, einschliesslich in neuronalen Primärkulturen einen programmierten Zelltod auslösen kann (Raff et al., 1993; Falcieri et al., 1993; Bertrand et al., 1994; Koh et al., 1995; Wiesner et al., 1996). Zusätzlich wurde

durch Einsatz des Neurotoxins Ethylcholin-Aziridinium (AF64A) ein Modell entwickelt, das durch das Auftreten eines verzögerten apoptotischen Zelltodes charakterisiert ist. AF64A, das initial zur Erzeugung eines *in vivo*-Modells der cholinergen Hypofunktion eingeführt wurde (Fisher et al., 1982; Übersichtsarbeit bei Hanin, 1996) führt zur Auslösung eines neuronalen Zelltods *in vivo* und *in vitro* durch Aktivierung von Mechanismen der Apoptose (Rinner et al., 1997; Lautenschlager et al., 2000). Durch die Struktur-homologie mit dem Cholin-Molekül (siehe Abb. 4) wird AF64A über den nieder- und hochaffinen Cholintransporter in die Zellen aufgenommen.

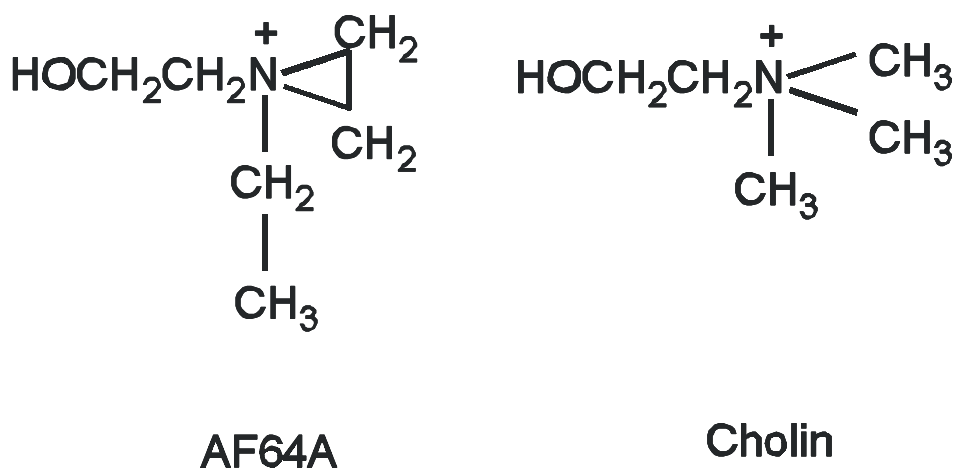


Abb. 4: AF64A und Cholin. Die Strukturhomologie erklärt die Aufnahme von AF64A über den Cholintransporter in Zellen. Der Aziridiniumring am AF64A-Molekül ist hochreaktiv und führt zu chemischen Interaktionen mit Makromolekülen.

Eine Beteiligung von Glutamat bei der Neurotoxizität durch AF64A *in vivo* wurde ausgeschlossen (Hörtnagl et al., 1991). In primären, neuronalen Kulturen verschiedener Hirngebiete löst AF64A einen verzögerten, neuronalen Zelltod innerhalb von 2 – 3 Tagen aus (Lautenschlager et al., 1997; 2000). Als ein drittes Modell fungierte die apoptotische Komponente der OGD, die durch die Zugabe von Glutamatantagonisten demaskiert wurde (Gotttron et al., 1997).

2 Aufgabenstellung

Die neuroprotektiven Eigenschaften der endogenen Substanzen Melatonin und 17 β -Estradiol wurden bisher vorwiegend in exzitotoxischen bzw. nekrotischen Modellen der Zellschädigung *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Ziel dieser Studie war es, die Wirksamkeit der beiden Hormone auf langsam-fortschreitende apoptotische Zelldegeneration *in vitro* zu untersuchen und mögliche Wirksamkeitsunterschiede gegenüber vorwiegend nekrotischer Zelldegeneration herauszuarbeiten.

Als besonderer Schwerpunkt galt dabei, durch die Anwendung verschiedener Modelle der Neurodegeneration mögliche Unterschiede in den Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung dieser endogenen Substanzen herauszufinden und so ein grösseres Verständnis über aussichtsreiche Strategien zukünftiger Therapieoptionen bei unterschiedlichen zentralnervösen Erkrankungen wie dem Schlaganfall und neurodegenerativen Prozessen zu erhalten.

Insbesondere bei dem antioxidativ wirksamen Melatonin sollte die Frage beantwortet werden, ob die neuroprotektive Potenz bei neuronalem Schaden nachgewiesen werden kann, der nicht unmittelbar mit oxidativem Stress oder Exzitotoxizität verbunden ist.

Auch die neuroprotektiven Fähigkeiten von 17 β -Estradiol sind vorwiegend in neurodegenerativen Modellen untersucht worden, die mit Exzitotoxizität oder oxidativem Stress assoziiert sind. Besonders beim Schlaganfall sind die neuroprotektiven Eigenschaften von 17 β -Estradiol näher charakterisiert (Hurn et al., 2000).

Zusätzlich interessierten uns Unterschiede in der Effektivität der neuroprotektiven Wirkung in unterschiedlichen Hirnregionen. Regionale Unterschiede könnten sich daraus ergeben, dass Rezeptoren, die das neuroprotektive Signal vermitteln, unterschiedliche regionale Verteilungen aufweisen. Es ist auch bekannt, dass bei neurodegenerativen Erkrankungen neurodegenerative Prozesse primär bzw. in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung bestimmte Regionen betreffen, aber in fortgeschrittenen Stadien auch andere Regionen betreffen können. Deswegen wurden für die Versuche mit 17 β -Estradiol primäre neuronale Kulturen von drei unterschiedliche Hirnregionen gewonnen: Kortex, Septum und Hippokampus. Aus oben ausgeführtem ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Wirken Melatonin und 17 β -Estradiol bei apoptotisch-neuronalem Zelluntergang neuroprotektiv? Vergleich der Effektivität mit exzitotoxisch-nekrotischen Modellen.
- 2) Gibt es antiapoptotische Wirkmechanismen beim Melatonin, die unabhängig von der radikalabfangenden bzw. antioxidativen Eigenschaft bestehen?
- 3) Beruhen antiapoptotische Effekte des 17 β -Estradiols auf Rezeptorinteraktionen, Membraninteraktionen oder antioxidativen Eigenschaften? Wird die Expression von Proteinen der Bcl-Familie nach Kurz- oder Langzeitgabe von 17 β -Estradiol in den drei Regionen moduliert? Ist die Veränderung der Expressionsmuster blockierbar mit Proteinsynthesehemmung oder Rezeptorantagonisten?
- 4) Wirkt 17 β -Estradiol in den drei untersuchten Regionen Septum, Hippokampus und Kortex gleich effektiv bei langsam-apoptotischer Zelldegeneration? Worauf lassen sich mögliche Unterschiede zurückführen?

3 Material und Methoden

3.1 Primäre, neuronale Zellkulturen

Die primären, neuronalen Zellkulturen der Großhirnrinde (Kortex), des Hippokampus und des Septums wurden aus Embryonen am Embryonaltag E17 von trächtigen Wistarratten gewonnen. Die Kulturen wurden nach der Methode von Brewer (1995) mit folgenden Veränderungen präpariert.

Die Wistarrattenweibchen wurden mit Äther in eine tiefe Narkose versetzt und dann durch Genickbruch getötet. Sofort wurde das Fell mit 70% Alkohol desinfiziert, der Uterus entnommen und in eine sterile Glaspetrischale überführt. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Embryonen wurden aus dem Uterus bicornis herauspräpariert und in kalte phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium/Magnesium (PBS) überführt. Die äußere Haut des Kopfes und der knöcherne Anteil der Schädelplatte wurden unter dem Mikroskop (Leica 2000)

eröffnet und die Gehirne entnommen. Nach Entfernung der Hirnhäute (Meningen) wurden Kortex, Hippokampus und Septum herauspräpariert, dreimal mit PBS ohne Calcium/Magnesium gespült und 15 min bei 36,5 ° C mit Trypsin/EDTA [0,05 / 0,02% Gewicht pro Volumen (w/v)] in PBS ohne Calcium/ Magnesium inkubiert. Anschließend wurde wieder mit PBS und danach mit Nährmedium gespült (Eagle's modifiziertes Medium, im folgenden Dissoziationsmedium genannt, mit 10% fötalem Kälberserum, 10 mM HEPES, 44 mM Glukose, 100 internationalen Einheiten (IE) Penicillin und Streptomycin / ml, 2 mM L -Glutamin, 100 IE Insulin / l).

Das Gewebe der drei Hirnregionen wurde dann mit einer Glaspasteurpipette in diesem Medium vorsichtig dissoziiert und dann zentrifugiert (210 x g für 2 min bei Raumtemperatur).

Das Pellet wurde in sogenanntem Startermedium aufgenommen (Neurobasales Medium (NBM) mit B27-supplement (10 ml auf 500 ml), 100 IE Penicillin / Streptomycin / ml, 0,5 mM L-Glutamin und 25 µM Glutamat).

Die Zellzahl wurde mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Trypanblau wurde zur Färbung toter Zellen verwendet. So konnte ein Überblick über das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen gewonnen werden und eine Aussage zur Qualität der Präparation gemacht werden.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 200.000 / cm² in Zellkulturplatten mit 6 oder 24 Vertiefungen in Startermedium ausgesät, die zuvor in folgender Weise beschichtet wurden: Inkubation mit Poly-L-Lysin (0,5% w/v in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur, Spülen mit PBS, erneute Inkubation mit Kollagen G (0,03% w/v in Dissoziationsmedium) für 1 h bei 37° C, anschließendes zweimaliges Spülen der Zellkulturplatten mit PBS.

In die Vertiefungen der Zellkulturplatten wurde dann Startermedium vorgelegt und im nächsten Schritt die Zellen ausgesät. Die Kulturen wurden in Brutschränken mit 5% CO₂-Gehalt und 36,5° C gehalten. Das Medium wurde am 4. Tag beginnend zweimal pro Woche jeweils zur Hälfte durch neues Neurobasales Medium ersetzt, jetzt aber ohne Beigabe von 25 µM Glutamat (sonst wie oben beschrieben.)

3.2 Modelle der Zellschädigung

Die Kulturen wurden in allen Zellschädigungsmodellen nach 10 – 14 Tagen Kulturzeit behandelt (days *in vitro*; DIV). Vor Versuchsbeginn wurde das Medium aller Vertiefungen einer oder mehrerer Platten gesammelt, gemischt und zur Hälfte durch neues Medium ersetzt. Dieses Gemisch wurde allen Zellen vor dem Start des Experiments verabreicht. Das Ergebnis waren identische Volumina und Zusammensetzung des Mediums für alle Vertiefungen als Ausgangsbedingung zu Beginn des Experiments.

3.2.1 Ethylcholin-Aziridiniumion (AF64A)

AF64A wurde aus Acetylethylcholin Mustard nach der Methode von Fisher hergestellt (Fisher et al., 1982). Die Mustard-Form wurde in bidestilliertem Wasser in der Konzentration von 1 mM Stammlösung aufgelöst und für 20 Minuten auf einen pH von 11,5, danach für eine Stunde auf einen pH von 7,3 titriert. Die Kontrolllösung wurde ebenfalls auf die pH-Werte eingestellt, anschließend filtriert und zur Verdünnung der Stammlösung verwendet.

AF64A wurde dem Medium im Verhältnis 1 : 25 für 5 oder 72 h zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10, 40 oder 80 μM erreicht wurde. Nach einmaligem Auswaschen wurde konditioniertes Medium, also Medium das vorher auf neuronalen Kulturen durch die Zellen in seiner Zusammensetzung optimiert worden war, ohne AF64A zurückgegeben. Vehikel-behandelte Zellen erhielten die gleiche Behandlung mit Kontrolllösung.

3.2.2 Staurosporin

Staurosporin wurde als 10 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt und mit PBS zu 10 und 30 μM Lösungen verdünnt, die dem Medium im Verhältnis 1 : 100 zugegeben wurden. Daraus ergaben sich Endkonzentrationen von 100 und 300 nM Staurosporin im Medium. Das Vehikel wurde in gleicher Weise verdünnt und mit der höchsten DMSO-Konzentration dem Medium zugegeben.

3.2.3. Kombinerter Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD)

Für die OGD wurde das Medium abgenommen und bei 36,5° C aufgehoben. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gespült und in einer deoxygenierten gepufferten Salzlösung ohne Glukose, BSL_0 (bestehend aus: 143,8 mM Na^+ , 5,5 mM K^+ , 0,8 mM Ca^{2+} , 0,8 mM Mg^{2+} , 125,3 mM Cl^- , 26,2 mM HCO_3^- , 1,0 mM $\text{H}_2\text{SO}_4^{2-}$, 0,8 mM SO_4^{2-} , 0,01 mM Glycin, pH 7,4) der OGD bei einem $\text{pO}_2 < 2$ mm Hg (5% CO_2 / 95% N_2) für 120 – 140 Minuten unterzogen (Bruer et al., 1997). Der pO_2 wurde mit einer polarographischen Elektrode gemessen (Licox, GMS, Kiel). In der Hypoxiekammer wurde die Temperatur bei $36,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit ($> 90\%$) konstant gehalten. Anschließend wurde das aufgehobene Medium wieder zurückgegeben.

Für eine Standardisierung des Zellschadens wurde ein maximaler Zellschaden mit 5 mM Glutamat ausgelöst (als „totaler Zelltod“ bezeichnet).

Als Kontrollen wurden Schwesterkulturen für die gleiche Zeit (120 – 180 Minuten) mit balanzierter Salzlösung mit 20 mM D-Glukose (BSL_{20}) inkubiert und im Brutschrank belassen.

3.2.3 OGD mit Blockade der exzitotoxischen Komponente mittels des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonisten (NMDA) MK801

MK801 wurde dem Medium der Zellkultur in einer Endkonzentration von 10 μM (100 x Stammlösung in PBS) 30 Minuten vor der OGD (180 Minuten) und den jeweiligen balanzierten Salzlösungen (BSL_0 und BSL_{20}) zugegeben.

3.2.4 Glutamat

Vor der Glutamataexposition wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und bis zur Wiederverwendung bei 36,5° C gelagert. 100 μM Glutamat (100 x Stammlösung in PBS) wurde dem Medium der Zellkultur für 0,5 Stunden zugesetzt, anschließend mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gespült und das ursprüngliche Medium wieder zugeführt.

3.3 Vorbereitung der Zellkulturen, Versuchsaufbau und pharma-kologische Interventionen

Neuronale Primärkulturen wurden nach 10 DIV Kultivierungszeit am Versuchstag ein Teil des Mediums entnommen und in einem Falcon-Tube gemischt. Die gleiche Menge frisches neurobasales Medium wurde dem schon konditionierten Medium zugegeben und 0,5 ml dieser Mischung pro 24er-Vertiefung oder 2 ml pro 6er-Zellkulturvertiefung zugegeben, nachdem zuvor das restliche Medium aus den Zellkulturen abgesaugt wurde. So wurden mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung und Menge des Mediums vor Versuchsbeginn ausgeglichen. Die folgenden Substanzen sind in unterschiedlichen Vehikeln aufgelöst worden. Diese Vehikel werden in Tabelle 1 für jede Substanz einzeln aufgeführt und wurden bei Verdünnungsreihen immer in der höchsten Konzentration den Kontroll-schwesterkulturen zugegeben. Vehikel und Substanzen wurden als 100fach-konzentrierte Lösung angesetzt, so dass 5 μ l pro 24er-Vertiefung und 20 μ l pro 6er-Vertiefung in die Kultur zugegeben wurden. Angegeben sind Endkonzentrationen in der Zellkultur. Die Konzentrationen sind der Literatur entnommen und / oder in eigenen Versuchen überprüft worden. Die Applikationszeitpunkte variierten je nach Substanz und Schadensmodell und sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Substanzen, Lösungsvehikel, Auflösung, Verdünnung und verwendete Endkonzentration für die verwendeten Substanzen in alphabetischer Reihenfolge.

Substanz	Vehikel	Auflösung und Verdünnung
<i>N-tert</i> -Butyl- α -Phenylnitron (PBN)	DMSO (0,2% Endkonzentration)	500 mM Stammlösung; Verdünnung mit H ₂ O; Endkonzentrationen von 0,1 und 1,0 mM
Cycloheximid (CHX)	Neurobasales Medium	500 ng / ml Endkonzentration
Dimethylthiourea (DMTU)	PBS	Endkonzentrationen von 1 und 10 mM
17 β -Estradiol (Cyclodextrin-gekoppelt)	PBS	Wasserlösliches 17 β -Estradiol mit Endkonzentrationen von 30 nM – 10 μ M
ICI 182,780	DMSO (0,001% Endkonzentration)	100 mM Stammlösung, Verdünnung mit H ₂ O, Endkonzentration: 1 μ M
LY 294002	DMSO (0,008% Endkonzentration)	65 mM Stammlösung, Verdünnung mit H ₂ O, 5 μ M Endkonzentration
Melatonin	Ethanol (Endkonzentration von 0,01% in der Zellkultur)	20 mM Stammlösung in 40% Ethanol in H ₂ O, Verdünnung in PBS mit Endkonzentrationen von 0,01 – 2,00 mM.
Tamoxifen	Ethanol (0,01% Endkonzentration)	10 mM Stammlösung in reinem Ethanol, Verdünnung in H ₂ O, Endkonzentration 1 μ M
Z-VAD-FMK	DMSO (0,2 % Endkonzentration)	50 mM Stammlösung in DMSO wurde mit H ₂ O weiterverdünnt und eine Endkonzentration von 100 μ M eingesetzt

3.4 Evaluierung der Zellschädigung

Das Schädigungsausmaß wurde erstens qualitativ durch Beurteilung der Morphologie der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie oder dem Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase-medierten dUTP Nick-End Labeling (TUNEL-Färbung)

apoptotischer Zellen sowie Analyse der oligonukleosomalen DNS-Fragmentierung und zweitens quantitativ mit verschiedenen biochemischen Assays vorgenommen. Dazu gehörten die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Medium als Maß des Verlusts der Zellmembranintegrität sterbender Zellen, sowie die Messung des Thiazolylblau (MTT)-Metabolismus lebender Zellen. Ebenfalls wurden TUNEL-gefärbte Zellen gezählt. Auch die semiquantitative Analyse der Spaltprodukte des α -Fodrans infolge von Protease-aktivität durch Calpaine und / oder Caspasen wurde zur Beurteilung der Zellschädigung eingesetzt.

Ein Schwerpunkt bei der Evaluierung der Zellschädigung lag auf der Unterscheidung von Apoptose und Nekrose bzw. möglichen Zwischenformen des Zelluntergangs. Die unten näher beschriebenen Methoden der Evaluierung von Zellschäden sind zur Unterscheidung der Art des Zelluntergangs unterschiedlich geeignet worauf bei der Beschreibung der Methode jeweils kurz eingegangen wird.

3.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die morphologischen Veränderungen der Zellkulturen nach Schädigung wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Leitz, DM IL) und einer Photokamera (Minolta, Dynax 5xi) nach 24, 48 und 72 h dokumentiert. Die lebenden Neurone erscheinen hier mit relativ grossen Zellkörpern mit glatter Zellmembran, im Verhältnis zum relativ schmalen Zytoplasmasaum grossen Zellkern mit mehreren Nukleolen und einem ausgeprägten Netzwerk aus langen Neuriten.

Morphologische Charakteristika der Apoptose sind Neuritendegeneration, Schrumpfung des Zellkörpers und Ansammlung kondensierter Partikel im Zellkern und Zerfall in apoptotische Körperchen, die in der Zellkultur mangels der Möglichkeit der Phagozytose schliesslich lysiert werden.

Die Nekrose geht mit einer Schwellung des Zellkörpers und des Zellkerns einher. Die Zellen zeigen ein balloniertes Bild mit doppelter Grösse des Zellkörpers und glatt begrenzter Membran. Freie Kernreste nach Zelllyse treten auf.

3.4.2 Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätsmessung

Die LDH-Aktivität wurde im Überstand der Zellkulturen nach verschiedenen Zeiten gemessen. Die LDH-Ausschüttung in das Medium der Zellen gilt als Maß für die Desintegrität der Zellmembran. Der Anstieg der LDH-Aktivität ist unabhängig von der Art des Zelluntergangs zu beobachten. Entscheidende Unterschiede ergeben sich aus der Kinetik und den Maximalwerten der LDH-Ausschüttung bei den verschiedenen Zellschädigungsmodellen. Die LDH-Ausschüttung läßt keinen Rückschluß auf die Todesform zu, korreliert aber außerordentlich gut mit der Zahl untergegangener Zellen (Koh et al., 1987).

Zur Messung der LDH-Aktivität wurden 25 µl Medium jeder Vertiefung als Probe entnommen und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Außerdem wurden noch 25 µl Enzyme-Standard control-2-E in Doppelbestimmung auf jede Platte pipettiert. Dieser Standard von Sigma enthielt eine LDH-Aktivität von 500 Units/ml.

Jeder Vertiefung der Platte wurde anschließend 125 µl 0,1 M LDH-Puffer zugefügt. Dieser Puffer wurde als 10 x Stammlösung (1 M) zubereitet. Dazu wurden 45,3 g KH_2PO_4 (MW 136,1) und 116,1 g K_2HPO_4 (MW 174,2) in circa 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, auf 1000 ml aufgefüllt und mit H_2O 1 : 10 verdünnt.

Jeder Vertiefung wurde im darauffolgenden Schritt 100 µl β -NADH-Lösung zugefügt, die jeden Tag frisch hergestellt wurde [3 mg β -NADH, reduzierte Form (MW 709,4) / 10 ml 0,1 M LDH-Puffer]. Die Mikrotiterplatte wurde im nächsten Schritt in das Plattenlesegerät gestellt. Den Vertiefungen wurde nun 25 µl Pyruvatlösung zugefügt [1,25 g Na-Pyruvat (MW 110) / 500 ml 0,1 M LDH-Puffer] und diese sofort anschließend bei 340 nm Wellenlänge zehn Mal alle 20 Sekunden gemessen. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm zeigte die Abnahme von Substrat (β -NADH) in dieser Zeit als annähernd lineare Funktion. Die negative Steigung dieser Funktion konnte nun auf die Extinktionsabnahme der Standardlösung mit 500 Units Aktivität (Sigma enzyme control 2-E) bezogen werden, so dass sich die LDH-Aktivitäten in Units / ml Medium der Proben errechnen ließen.

3.4.3 Thiazolylblau (MTT)-Metabolismus

Dieser metabolische Assay basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (Thiazolylblau) in das purpurrote Formazan durch mitochondrielle Enzyme in metabolisch aktiven Zellen. Eine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose ergibt sich nur aus der Kinetik des Verlusts der metabolischen Aktivität, tritt jedoch grundsätzlich bei beiden Zelluntergangsformen auf.

Es wurden den Zellen 500 µg MTT / ml Medium zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 70 – 80 Minuten bei 36,5° C wurde die Reaktion mit 10%-igem Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) in 0,01 M HCl gestoppt und anschließend 48 h bei 36,5° C mit Verdunstungsschutz durch Parafilm nochmals inkubiert. Die Detektion erfolgte photometrisch im Plattenlesegerät bei 550 nm. Als Leerwert wurde dieselbe Prozedur mit Medium ohne Zellen durchgeführt. Dieser Leerwert wurde von jeder Probe abgezogen. Die quantitative Darstellung erfolgte in Prozentanteilen der Kontrollen.

3.4.4 Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase-mediiertes dUTP Nick-End Labeling und Zellzählung

Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase-mediiertes dUTP Nick-End Labeling (TUNEL-Färbung) wurde mit dem kommerziell erwerblichen ApopTag Kit (Qbiogene, Grünberg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch dieses Verfahren werden Strangbrüche der DNS markiert, die durch Endonukleaseaktivität in apoptotischen Zellen gebildet werden.

Für jedes Schadensmodell wurden die TUNEL-positiven Zellen aus 2 unabhängigen Präparationen bzw. Experimenten ausgewertet. Hierzu wurden vom verblindeten Experimentator in 20 zufällig ausgewählten, hochauflösenden Feldern (high power fields, entspricht 400x Vergrößerung) TUNEL-positive Zellen ausgezählt. Die Färbung wurde jeweils an drei Glasplättchen pro Kondition und Experiment durchgeführt.

3.4.5 DNS-Isolation und Gelelektrophorese

Die Fragmentierung der DNS in der Gelelektrophorese beruht auf der Aktivität von Endonukleasen, die bei Apoptose zu DNS-Fragmenten von charakteristischer Grösse (circa 180 Basenpaare) führt.

Die DNS wurde aus 2×10^6 Zellen isoliert, die 48 bzw. 72 h nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von AF64A mit einem Zellschaber vom Boden der Plattenvertiefung gekratzt und im Medium in ein 2-ml Eppendorfgefäß überführt wurden. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten und 5000 rpm (Umdrehungen pro min) bei 4° C zentrifugiert (Hettich Universal RF, Rotor 1412, im folgenden immer eingesetzt). Es wurde ein modifizierter kommerzieller Easy-DNA-Kit (Invitrogen, Niederlande) benutzt. In Kürze beschrieben, wurde dem Pellet 350 µl von Lösung A (Lysepuffer) zugegeben, nach Durchmischung 10 min bei 65° C inkubiert und 150 µl von Lösung B (Präzipitationspuffer) zugegeben. Nach Zusatz von 500 µl Chloroform erfolgte eine Zentrifugation (15000 rpm, 10 min, 4° C). Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die weitere DNS-Präzipitation erfolgte dann durch die Zugabe von 1 ml eiskalten Ethanol (100%) und Inkubation für 30 min auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (15000 rpm, 10 min, 4° C) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und 500 µl Ethanol (80%) zum Waschen der DNS dazugegeben, ohne das Pellet erneut zu resuspendieren. Nach einer weiteren Zentrifugation (15000 rpm, 10 min, 4° C) wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und der Restalkohol konnte kurz verdunsten. Nach Resuspension der Pellets in 25 µl Tris / EDTA-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) mit RNase (2 µl RNase / 100 µl Puffer) wurde die DNS quantifiziert. Dazu wurde die Probe 1 : 40 mit H₂O verdünnt und bei 260 nm Wellenlänge die Extinktion bestimmt. Zur Berechnung der DNS-Menge in ng / µl wurde die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Extinktion}_{260} \times 50 \text{ ng} / \mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNS-Menge in ng} / \mu\text{l}.$$
 Ein Mikrogramm DNS wurde in einem einprozentigem Agarosegel in TBE-Puffer [1 Liter Puffer setzte sich zusammen aus 108 g Tris, 55 g Borsäure und 40 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)] bei 70 Volt Spannung circa 180 Minuten aufgetrennt und die DNS mit Ethidiumbromid in einer Konzentration von 50 µg / ml gefärbt. Unter UV-Licht konnte die DNS visualisiert und mit einer Videokamera Bilder zur Dokumentation aufgenommen werden.

3.4.6 α -Fodrin-Spaltprodukte (Westernblot-Analyse)

Um zwischen vorwiegend nekrotischem oder apoptotisch induziertem Zelltod besser differenzieren zu können, haben wir uns die α -Fodrin-Spaltprodukte in den unterschiedlichen Modellen zur Differenzierung der Todesarten speziell angeschaut. Hierbei ist die Spaltung des intakten 240 kDa Proteins in die 150, 145 und 120 kDa großen Bruchstücke durch unterschiedliche Proteasen vermittelt, die Calpaine und die Caspasen. Laut Nath und Mitarbeitern (1996) ist das 120 kDa-Fragment spezifisch für die Apoptose und ist durch Caspase-3 vermittelt während das 150 kDa-Fragment sowohl durch Calpaine als auch durch Caspase-3 geschnitten wird (Übersichtsarbeit bei Wang, 2000).

3.5 Westernblots

3.5.1 Ernten der Zellen und Zelllyse

Vor dem Ernten wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und dann mit 150 μ l Lyse-Puffer pro 6-well-Vertiefung aufgenommen. Der Lysepuffer setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1% Triton x-100 und Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Boehringer-Mannheim, Deutschland). Die Zellen wurden mit einer umgedrehten blauen Eppendorfpipettenspitze vom Boden der Plattenvertiefung gekratzt.

Das Zelllysate wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 15 min auf Eis bis zur vollständigen Zelllyse inkubiert, gemischt und 20 min mit 12.000 Umdrehungen pro Minute bei 4° C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein Assay von Pierce bestimmt (siehe 3.5.2.).

3.5.2 Proteinquantifizierung (BCA-Assay)

Dazu wurde in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte eine Standardreihe mit einer Albuminkonzentration von 1 mg / ml in Doppelbestimmung pipettiert. Es wurden also 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 µg Albuminstandardlösung pipettiert. Als Leerwert wurden 0 µl verwendet. Von den Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung 2 und 4 µl pipettiert und alle Vertiefungen mit 250 µl der BCA-Reaktionslösung versehen. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 30 min bei 36,5° C inkubiert und darauf im Plattenlesegerät Extinktionen bei 550 nm gemessen.

Die Extinktionswerte der Proben lagen immer im Bereich der Standardkurve und die Extinktionswerte waren in diesem Bereich annähernd linear und proportional zur Proteinkonzentration. Nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve konnten die Proteinwerte errechnet werden.

3.5.3 Gelelektrophorese, Blotting und Visualisierung der Banden

Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit 2 x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) verdünnt, der wie folgt zusammengesetzt war: 2 ml 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,2 g SDS; 5 ml Glycerin; 0,1 ml Bromphenolblau (1%ige Lösung in Ethanol); 2,4 ml H₂O_{bidest.} β-Mercaptoethanol wurde den Proben immer frisch in einer Konzentration von 1 : 20 zugesetzt.

Anschließend wurden die Proben 3 min im Wasserbad gekocht. Auf einem 10-prozentigen SDS-Polyacrylamid-Minigel wurden 10 µg Protein pro Slot geladen und über 40 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden halbtrocken (semidry) auf Polyvinylidendifluoridmembranen (PVDF-Membranen) mit 1 mA pro cm² für 90 Minuten transferiert. Die PVDF-Membran wurde für eine Stunde mit 5% Trockenmilch in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20) zum Block unspezifischer Bindungen der Antikörper inkubiert. Die Primärantikörperinkubation erfolgte über Nacht in TBS-T-Puffer mit 1% Trockenmilch mit 0,02% Natrium-Azid. Alle verwendeten Primärantikörper waren monoklonale Maus-Antikörper (siehe Materialien und Ergebnisse). Danach wurde die Membran für eine halbe Stunde mit TBS-T-Puffer mit mehrmaligem Austausch des Puffers gewaschen. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte gegen monoklonale

Maus-Antikörper, die mit Merrettichperoxidase gekoppelt waren. Die PVDF-Membranen wurden für eine Stunde in einprozentiger Trockenmilch in TBS-T-Puffer mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Titer 1:5000). Danach wurde erneut eine halbe Stunde mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion des Signals erfolgte mit einem ECL-Kit (enhanced-chemiluminescence-Kit) und Röntgenfilmen.

3.5.4 Semiquantitative Analyse der Bandendichten

Für die semiquantitative Auswertung der Bandenintensitäten wurden die gescannten Immunoblotfilme mit dem Computerprogramm Scion Image Software, Version Beta 4.0.2 (Scion Corporation) gemessen und ausgewertet. Dazu wurden die Bandendichten von drei verschiedenen und unabhängigen Western-blots getrennt für die jeweilige Struktur (kortikale und hippokampale Neurone) und für die unterschiedlichen Proteine verglichen. Die Bandendichten der jeweiligen Gruppen wurden für jeden Film addiert und als Gesamtsignal als 100% Pixel-Intensität definiert, so dass die individuellen Banden als Prozentzahl des Gesamtsignals errechnet werden konnten.

3.6 Immunzytochemie

3.6.1 Immunzytochemie zum Nachweis cholinerg Neurone

Für die Immunzytochemie zum Nachweis cholinerg Neurone wurden die septalen neuronalen Zellkulturen 18 Tage kultiviert und mit eiskaltem Methanol 15 Minuten lang bei Raumtemperatur fixiert. Die Peroxidase-basierte Immunzytochemie wurde mit einem affinitätsgereinigten Cholinacetyltransferase-(ChAT)-Antikörper aus der Ziege und dem DAKO LSAB Plus-Kit mit 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.6.2 Immunzytochemie zum Nachweis von Estrogenrezeptor- α und - β .

Für die Immunzytochemie der Estrogenrezeptoren wurden die Zellen auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 15 mm ausgesät und 12 Tage kultiviert. Die Kultu-

ren wurden einmal mit PBS gewaschen und mit frisch zubereitetem vierprozentigem Paraformaldehyd (4% PFA) in PBS 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen, mit 0,3% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Geblockt wurde mit einer Lösung aus 10% Ziegenserum und 1% Kälberserumalbumin in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Kulturen wurden dann entweder mit dem monoklonalen Antikörper gegen Estrogenrezeptor- α aus der Maus oder mit dem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen gegen Estrogenrezeptor- β jeweils mit einer Konzentration von 5 μg / ml für 48 h bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der primäre Antikörper mit einem mit Texas-rot gekoppeltem zweiten Antikörper gegen Maus- bzw. Kaninchenantikörper aus der Ziege detektiert (Antikörpertiter: 1:500, 30 min bei Raumtemperatur). Nach gründlichem Waschen wurden die Glasplättchen mit einem Einbettungsmittel (ImmunoFluor mounting Medium) auf Objektträgern aufgezogen und mit einem konfokalen Mikroskop angeschaut. Für die Negativkontrollen wurden die Immunzytochemien ohne den ersten Antikörper durchgeführt.

3.6.3 Konfokale Mikroskopie

Es wurde ein MRC600 Confokal Imaging System (Bio-Rad, Hemel Hempstead, England) in Verbindung mit dem Nikon Optiphot Mikroskop benutzt (Galazze et al., 1996). Ein Argon-Krypton-Laser wurde zur Anregung von Texas-Rot bei einer Wellenlänge von 568 nm benutzt. Das Bild wurde mit einem 63/1,30-Ölimmersionsobjektiv der Firma Leitz sichtbar gemacht. Alle konfokalen Parameter wurden während des Experiments konstant gehalten, um eine unverfälschte Vergleichbarkeit der septalen, hippokampalen und kortikalen Kulturen zu erhalten.

3.6.4 Quantifizierung der Ergebnisse

Aus jeder der drei Gehirnregionen, Kortex, Septum, und Hippokampus wurden 50 Felder zufällig von einem verblindeten Wissenschaftler ausgewählt und mit langsamer Geschwindigkeit gescannt. Jedes digitale Bild bestand aus 768 x 512 Pixels. Die durchschnittliche Pixelintensität jeder Zelle wurde selektiv von einer zweiten Person bestimmt und mit dem CoMOS Software-Programm (Biorad, Version 7.0) ausgewer-

tet. Dazu wurden circa 140 Zellen pro Region mit dem Cursor umfahren und das Median dieser Zellen errechnet. Das Median der Pixelintensitäten der 140 Zellen wurde dann als Kriterium für die relative Unterscheidung in Zellen „hoher“ oder „niedriger“ Intensität gewählt.

3.7 Messung der Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation ist ein indirektes Mass für die Menge der freigesetzten Radikale (Wong et al., 1987). So kann auftretender oxidativer Stress abgeschätzt werden, indem die Menge von Malondialdehyd, dem Hydrolyseprodukt der Lipidperoxide gemessen werden.

Die Zellen wurden dazu in 6-well-Platten ausgesät, zu verschiedenen Zeitpunkten mit PBS gewaschen, um mechanisch mit einer umgedrehten blauen Eppendorfspitze unter Zugabe von 1200 µl TBA-Reagenz pro Vertiefung geerntet zu werden. Diese Zellsuspension wurde in 2-ml-Eppendorfgefäßen auf Eis aufgenommen.

Dreißig ml des vollständigen Thiobarbitursäure-Reagenz (TBA-Reagenz) bestanden aus 15 ml Phosphorsäure (0,7 %), 5 ml TBA-Lösung (0,6 %), 1 ml Methanol-Lösung (1 %) und 9 ml H₂O.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µM Lösungen von Tetraethoxypropan verwendet, das bei Erwärmung Malondialdehyd freisetzt. Die Proben und die Standardreihe wurden 1 h bei 96° C inkubiert und anschließend bei 4° C und 12.000 Umdrehungen pro min für 5 min zentrifugiert.

Im Überstand wurde die Malondialdehydkonzentration in den Proben und der Standardreihe photometrisch bei 532 nm bestimmt. Im Bereich der Malondialdehydkonzentrationen der Standardreihe verlief die Extinktion linear und die Malondialdehydkonzentrationen der Proben lagen alle im Bereich der Standardkurve. So konnten die Konzentrationen von Malondialdehyd in den Proben anhand der Standardkurve ermittelt werden (Methode nach Wong et al., 1987).

3.8 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) gezeigt. Es wurden immer 2 – 3 Experimente zusammengefaßt. Dabei wurden die Rohdaten (zum Beispiel

LDH-Werte in Units / ml Medium) zusammengefaßt und erst anschließend die Kontrollwerte (basale LDH-Werte) zur besseren graphischen Darstellung in einigen Abbildungen abgezogen. Die basalen LDH-Werte sind in diesen Graphen in den Legenden jeweils angegeben.

Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA (one-way analysis of variance) mit dem Tukey-Test als posthoc-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ gekennzeichnet. Die einzelnen Werte für p sind in den Legenden gekennzeichnet.

3.9 Materialien

Produkt

Acetylcholin Mustard
 Agarose
 ApopTag Kit
 Äther
 B27-Supplement
 BAX-Antikörper (Maus), monoklonal
 BCA-Protein Assay
 Bcl-2 –Antikörper (Maus), monoklonal
 Bcl-x_L –Antikörper (Maus), monoklonal
 Borsäure
 Bromphenolblau
N-tert-Butyl- α -Phenylnitron (PBN)
 ChAT-Antikörper
 Chlorophorm
 DAKO LSAB Plus-kit
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Dimethylthiourea (DMTU)
 Easy-DNA™ Kit
 EDTA
 ELISA-Platten 96-Loch
 Enhanced Chemiluminescence Kit
 17- β -Estradiol (cyclodextrin-gekoppelt)
 Estrogenrezeptor- α -Antikörper, (Maus), monoklonal (Nr. 803-004-C050)
 Estrogenrezeptor- β -Antikörper, (Kaninchen), polyklonal (Nr. 210-135-C050)
 Ethidiumbromid
 α -Fodrin-Antikörper (Maus), monoklonal
 D-Glukose
 L-Glutamin
 Glycerin

Herkunft

Research Biochemicals International, Natick, MA, USA
 Sigma, Deisenhofen
 Qbiogene, Grünberg
 Merck, Darmstadt
 Life-Technologies/BRL, Eggenstein
 Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg
 Pierce
 Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
 Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
 Sigma, Deisenhofen
 Sigma, Deisenhofen
 Sigma, Deisenhofen
 Chemicon, Harrow, UK
 Sigma, Deisenhofen
 DAKO Diagnostika, Hamburg
 Sigma, Deisenhofen
 Sigma, Deisenhofen
 Invitrogen BV, Holland
 Sigma, Deisenhofen
 Falcon, Heidelberg
 Amersham oder Pierce, Rockford, IL, USA
 Sigma, Deisenhofen
 Alexis, Grünberg
 Alexis, Grünberg
 Sigma, Deisenhofen
 BIOTREND-Chemikalien, Köln
 Sigma, Deisenhofen
 Biochrom, Berlin
 Sigma, Deisenhofen

ICI 182,780	TOCRIS BIOTREND, Köln
IMMUNOFLUOR MOUNTING MEDIUM	ICN, Eschwege
Insulin	Berlin-Chemie
HEPES	Biochrom, Berlin
Kälberserum, fötales	Biochrom, Berlin
100 kb Standard	Gibco,
KH ₂ HPO ₄	Sigma, Deisenhofen
KH ₂ PO ₄	Sigma, Deisenhofen
Kollagen G	Biochrom, Berlin
LY 294002	Calbiochem, Bad Soden
Melatonin	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
MK801	Research Biochemicals International, Natick, MA, USA
Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin
Molekularstandard, high range	Sigma, Deisenhofen
MTT (Thiazolylblau)	Sigma, Deisenhofen
β-NADH, reduzierte Form	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodekylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Neurobasales Medium (NBM)	Life Technologies/BRL, Eggenstein
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Proteinase Inhibitor Cocktail	Boehringer Mannheim, Mannheim
Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilme	Kodak, Deutschland
Sigma Enzyme control 2-E	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
Tamoxifen	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen
Trockenmilch, non-fat	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
β-Tubulin-Antikörper (Maus), monoklonal	Boehringer Mannheim, Mannheim
Wistarratten	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin
Zellkulturplatten: 24 / 6 Vertiefungen	Falcon, Heidelberg
Anti-Maus-IgG-Immunglobulin-Antikörper (Ziege), Texas-rot-gekoppelt	Molecular Probes, Leiden, Holland
Anti-Maus-IgG-Immunglobulin-Antikörper (Ziege), Meerrettichperoxidase-gekoppelt (horseradish)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Z-VAD-FMK	Calbiochem / Novabiochem, Bad Soden

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des AF64A-Schadensmodells

4.1.1 Selektiver Zelltod cholinergischer Neurone in septalen Kulturen bei niedriger AF64A-Dosis

In septalen neuronalen Kulturen konnte bei niedriger Dosierung die selektive Toxizität von AF64A auf cholinerge Neurone gezeigt werden (Abb. 5). AF64A wird durch die höhere Affinität des cholinergen Transportsystems in den cholinergen Neuronen des Septums schon in sehr niedrigen Konzentrationen (5 μM) aufgenommen und ist daher für diese Neurone besonders toxisch. In höheren Konzentrationen werden andere Neurone gleichermaßen geschädigt. Diese generelle neurotoxische Wirkung von AF64A in den höheren Dosen lässt sich am besten durch Interaktion mit dem niedrig-affinen Cholinaufnahmesystem erklären, das virtuell in allen Zellen vorhanden ist, da Cholin beispielsweise essentieller Baustein von Membranen ist (Hanin 1996; Lautenschlager et al., 2000).

Die schädigende Wirkung betrifft also nur in den niedrigen Dosisbereichen relativ spezifisch cholinerge Neurone, die mit Immunzytochemie gegen die Cholinacetyl-Transferase (ChAT) dargestellt werden können. In Abb. 5 erkennt man ChAT-positive Neurone in einer Primärkultur des Rattenseptums, die nach einem Zeitverlauf von 72 h nach AF64A-Gabe (5 μM) eine retrograde Degeneration der Dendriten und die beginnende Desintegration des Perikarions mit Ausstülpungen des Zytoplasmas erkennen lassen. Diese morphologischen Veränderungen zeigten sich bei benachbarten ChAT-negativen Neuronen nicht.

In höheren Dosen werden nicht-cholinerge Neurone ebenfalls geschädigt. In den in dieser Arbeit verwendeten Dosen von AF64A (5 – 80 μM) werden Astrozyten nicht betroffen, wie nach immunzytochemischer Darstellung mit Antikörpern gegen GFAP (glial acid fibrillary protein) als Astrozytenmarker gezeigt wurde (Lautenschlager et al., 2000). Der genaue Mechanismus der Apoptoseauslösung durch AF64A ist jedoch nicht geklärt (Lautenschlager et al., 2000).

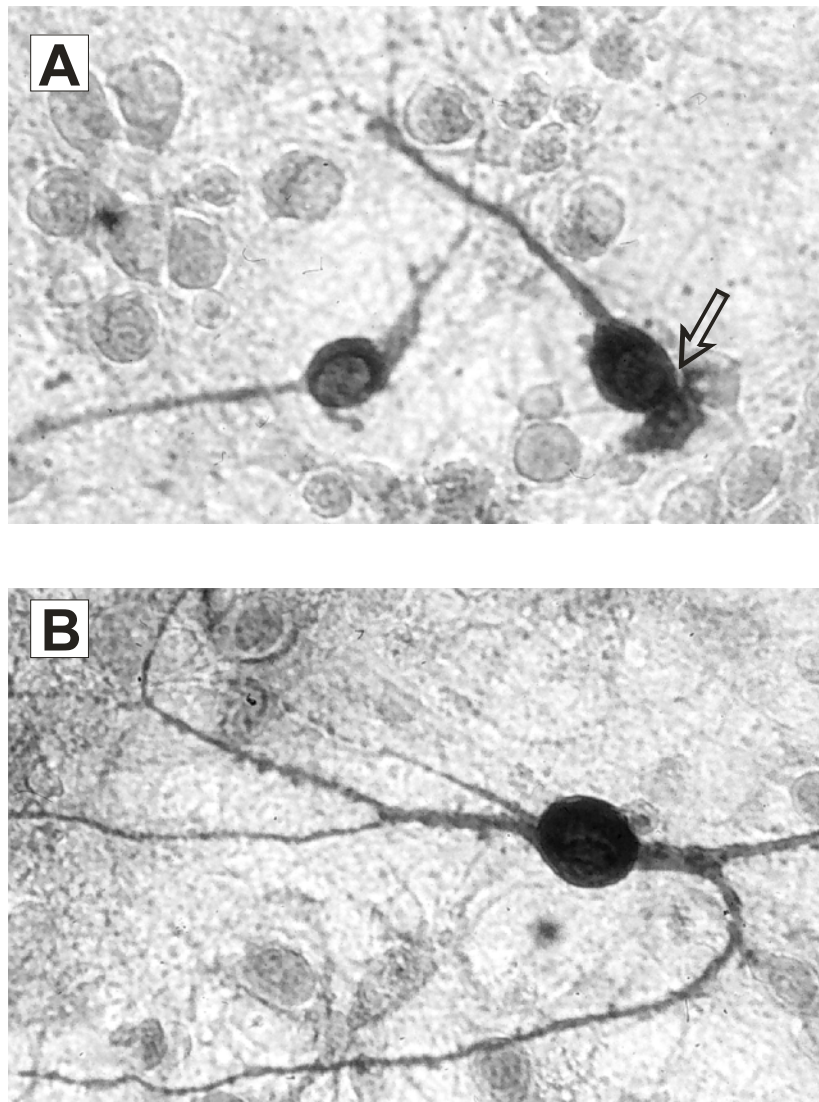


Abb. 5: ChAT-Immunzytochemie zur Darstellung cholinergischer Neurone in septalen Zellkulturen. 5 μ M AF64A wurde den Zellen am 18. DIV zugegeben und die Zellen nach 72 h fixiert und die ChAT-Immunzytochemie durchgeführt. A: Die ChAT-positiven Neurone zeigen eine retrograde Degeneration der Dendriten und den Beginn der Desintegrität des Perikarions (siehe Pfeil). ChAT-negative Neurone scheinen bei dieser Dosierung morphologisch nicht verändert. B: Kontrollkulturen zeigen intakte ChAT-positive Neurone mit verschiedenen weit ausgedehnten Fortsätzen. Zahlreiche kleine, sogenannte „dendritic spines“ sind am Ausläufer sichtbar. Vergrößerung x500.

4.1.2 Kinetik des LDH-Anstiegs und der Reduktion des MTT-Metabolismus nach AF64A-Behandlung

Primäre neuronale Zellkulturen reagierten auf AF64A mit einem verzögerten Ablauf der Zellschädigung, gemessen an der LDH-Freisetzung und der Reduktion des MTT-Metabolismus. Der Zeitverlauf und die Dosisabhängigkeit dieser Veränderungen ist in Abb. 6 dargestellt. Der MTT-Umsatz war anfänglich in der niedrigsten Dosis von AF64A (5 μ M) gesteigert. Diese Steigerung ist möglicherweise auf einen erhöhten

Stoffwechselumsatz in Astrozyten zurückzuführen, da mikroskopisch bei dieser Dosierung eine stärkere Färbung der Astrozyten mit Formazan, dem Endprodukt des MTT-Assays erkennbar war (nicht veröffentlichter Befund). In den höheren Dosen war diese Metabolismussteigerung in Astrozyten auch nicht mehr erkennbar.

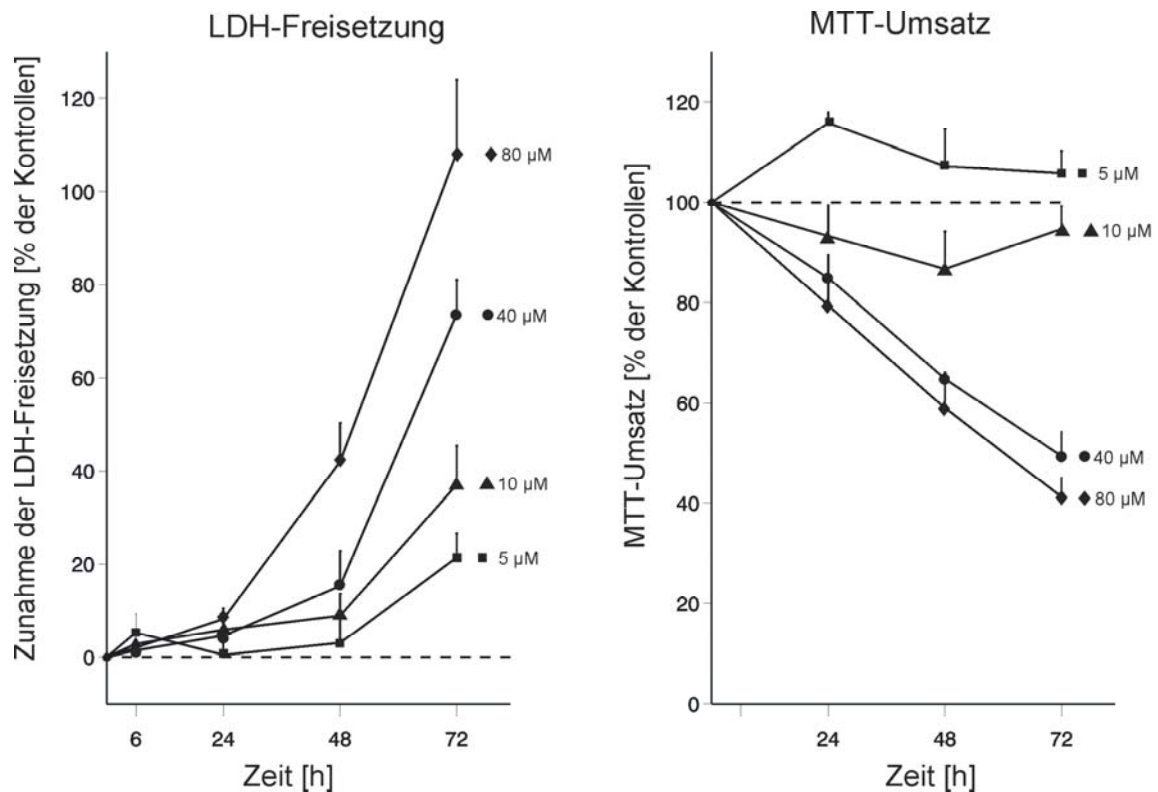


Abb. 6: Zeit- und dosisabhängige Veränderungen in kortikalen Neuronen nach AF64A-Exposition (5 – 80 µM AF64A). Die LDH-Aktivität ist hier als prozentuale Zunahme gegenüber den Vehikel-behandelten Kontrollkulturen dargestellt, um einen besseren Vergleich mit der Reduktion des MTT-Metabolismus zu ermöglichen. LDH-Freisetzung: n = 12; MTT-Assay: n = 5 pro Zeitpunkt und Zustand. Nach 24 h war im gesamten Dosisbereich von AF64A keine bis geringfügige LDH-Ausschüttung in das Medium detektierbar. Die LDH-Aktivität stieg nach 48 h bei den höheren Dosen markant an und war maximal erhöht nach 72 h. Bei der Dosierung von 40 und 80 µM fiel der MTT-Umsatz kontinuierlich bis 72 h ab, während in der niedrigsten Dosis von AF64A (5 µM) der MTT-Umsatz anfänglich anstieg.

4.1.3 Phasenkontrastmikroskopie AF64A-behandelter Kulturen im Zeitverlauf

In Abb. 7 ist der Zusammenhang zwischen LDH-Freisetzung und morphologischen Veränderungen in kortikalen Neuronenkulturen nach 40 µM AF64A dargestellt. Morphologische Veränderungen, charakteristisch für Apoptose (siehe 4.2.1.) und LDH-Anstieg im Medium waren erst 48 h nach AF64A-Behandlung erkennbar. Dieser Dosisbereich wurde für alle weiteren Versuche mit AF64A ausgewählt.

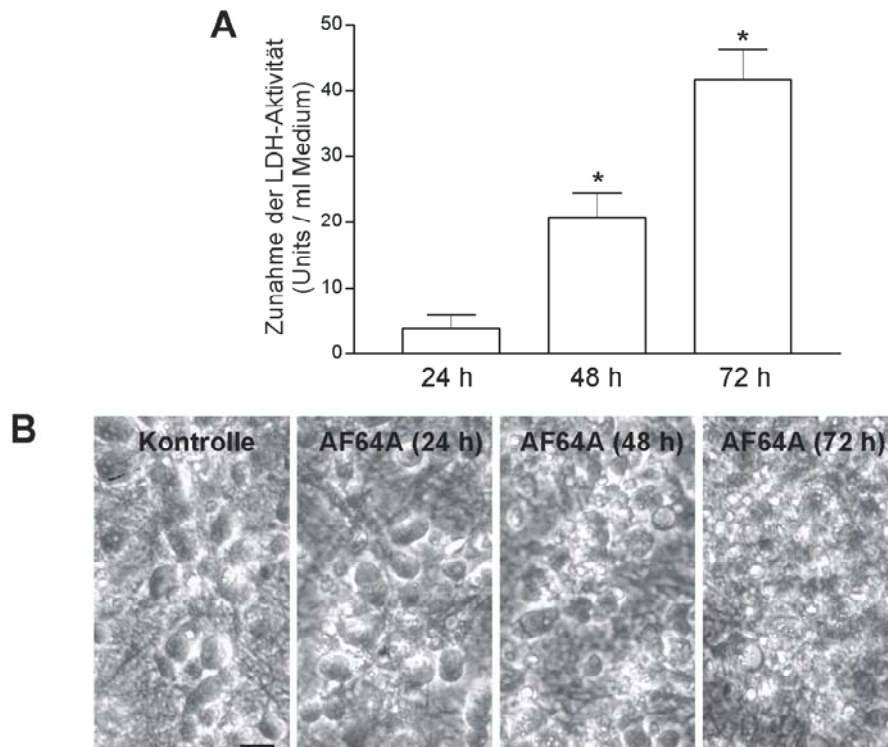


Abb. 7: A: Zusammenhang zwischen LDH-Freisetzung und morphologischer Veränderungen in kortikalen Neuronenkulturen nach 40 μ M AF64A. A: Nach 24 h war noch kein signifikanter LDH-Anstieg detektierbar, nach 48 h und 72 h zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der LDH-Freisetzung; n = 12 - 16. * p < 0,05 versus Vehikel-behandelte Kontrollen.. B: In diesen Versuchen wurden parallel Photographien von mikroskopischen Beobachtungen mit der Phasenkontrast-Mikroskopie angefertigt (Vehikel von AF64A; AF64A-Behandlung (40 μ M) nach 24, 48 und 72 h). Nach 24 h zeigten sich in den kortikalen Neuronen morphologisch noch keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollkulturen, während nach 48 – 72 h die neuronalen Zellen zunehmend morphologische Charakteristika der apoptotischen Degeneration aufwiesen (siehe 4.2.1.). Der Balken entspricht 10 μ m.

4.1.4 Oligonukleosomale DNS-Fragmentierung nach AF64A-Behandlung

Die enzymatische Fragmentierung der DNS während der Apoptose durch AF64A wurde erst nach 48 h beobachtet. Die charakterischen 180 Basenpaare großen Banden traten als charakteristisches Merkmal bei 40 und 80 μ M AF64A-Behandlung in kortikalen Zellen auf (Abb. 8):

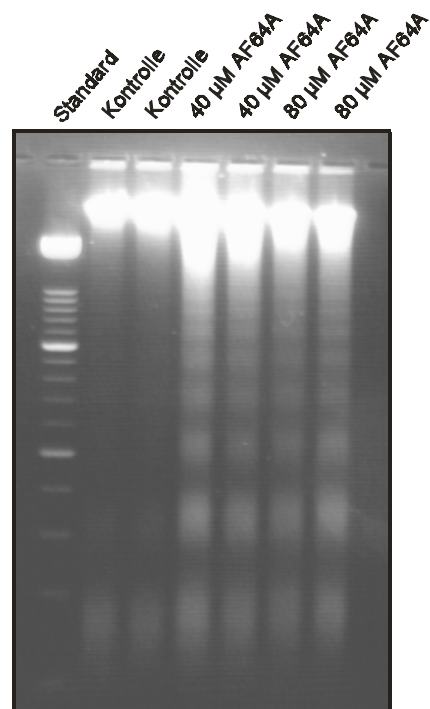


Abb. 8: DNS-Fragmentierung in kortikalen Kulturen nach 48-stündiger Behandlung mit AF64A (40 und 80 μM) im Vergleich zu Vehikel-behandelten Schwesterkulturen. Für jeden Zustand wurden 2 Proben von unterschiedlichen Zellkulturen benutzt. Als Standard wurde eine 100 bp Leiter aufgetragen.

4.1.5 AF64A-Toxizität und der unspezifische Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK

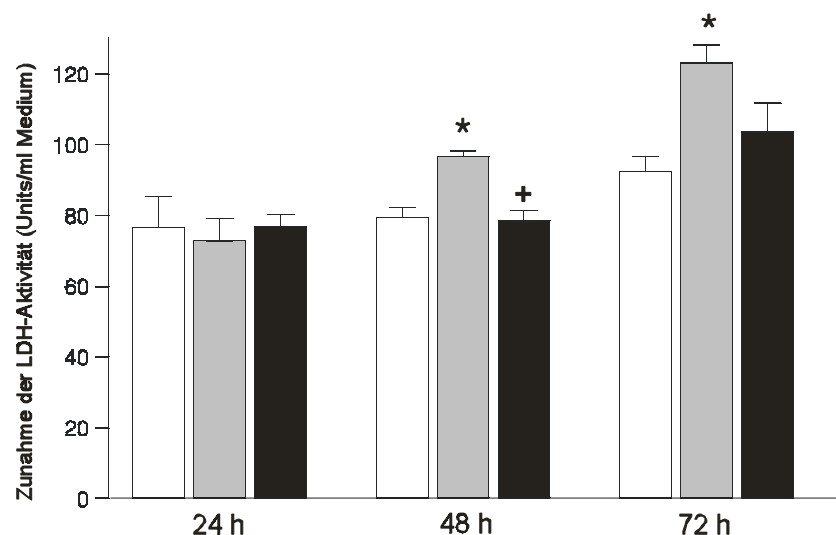


Abb. 9: Caspase-Hemmung durch Z-VAD-FMK schützte kortikale Neurone vor der AF64A-Toxizität. Die Kulturen wurden mit 100 μM Z-VAD-FMK 1 h vor und 24 h und 48 h nach Applikation von 40 μM AF64A behandelt. Der Zelltod wurde durch den Anstieg der LDH-Aktivität im Medium dokumentiert (24, 48 und 72 h). In der Gruppe der Behandlung mit Z-FAD-FMK + AF64A blieb die LDH-Aktivität auf Kontrollniveau. $n = 4 - 6$ für jede Gruppe; * $p < 0,01$ vs. Vehikel; + $p = 0,001$ vs. AF64A. □ Vehikel, ■ AF64A, ■ AF64A + Z-VAD-FMK.

Der durch AF64A ausgelöste LDH-Anstieg im Medium von kortikalen Neuronenkulturen konnte durch Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK, der ver-

schiedene Caspasen hemmt, verhindert werden. Dieser protektive Effekt war über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 72 h nachweisbar, wenn Z-VAD-FMK 1 h vor, 24 h und 48 h nach 40µM AF64A gegeben wurde (siehe Abb. 9).

4.2 Unterscheidung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod

Um zwischen den verschiedenen Zelltodesarten in den verschiedenen Zellschädigungsmodellen zu unterscheiden, haben wir neben der DNS-Fragmentierung noch weitere Methoden der Zelltod-Differenzierung in den vorwiegend langsam-degenerierenden Zelltodesarten mit charakteristischen Apoptoseereignissen (AF64A und Staurosporin) und den überwiegend exzitotoxischen Schadenskaskaden mit Anteilen der Nekrose (OGD + Glutamat) eingesetzt.

4.2.1 Morphologische Charakterisierung mit Phasenkontrastmikroskopie: Vergleich von Apoptose und Nekrose

Die morphologische Differenzierung der beiden Zelluntergangsformen erfolgte unter anderem mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie. Es zeigten sich nach der Gabe von 40 µM AF64A nach circa 48 h die typischen morphologischen Korrelate des langsamen, programmierten Zelltods, die nach 72 h maximal ausgeprägt waren. Es kam zum Auftreten der charakteristischen Zeichen der Apoptose mit Neuritendegeneration, Schrumpfung des Zellkörpers und Ansammlung kondensierter Partikel. Die Nekrose geht mit einer Schwellung des Zellkörpers und des Zellkerns einher und ließ sich bereits 24 h nach 120-minütiger OGD darstellen (siehe Abb. 10).

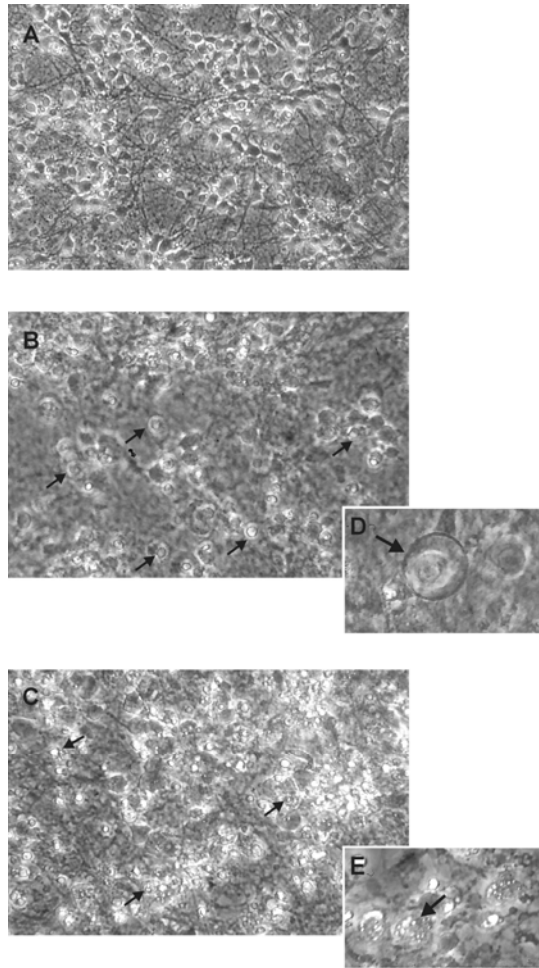


Abb. 10: Phasenkontrastmikroskopie kortikaler Neurone, die mit Vehikel behandelt, 48 h mit AF64A behandelt oder 120 min der OGD ausgesetzt wurden (Vergrößerung 250 x). A: Die Vehikel-behandelten Kontrollkulturen zeigten gesunde Neurone mit einem dichten Netzwerk von Neuriten. B: 24 h nach der OGD (120 min) zeigte sich eine Schwellung der Zellkörper- und Kerne (siehe Pfeile) als Zeichen des vorwiegend nekrotischen Zelluntergangs (D: Ausschnittsvergrößerung). C: 72 h nach AF64-Gabe (40 μ M) erschienen in einer Schwesterkultur die typischen morphologischen Charakteristika der Apoptose. Die Neuriten degenerierten, die Zellkörper schrumpften und kondensierte Partikel sammelten sich im Zellkern (siehe Pfeile). E: Ausschnittsvergrößerung.

4.2.2 TUNEL-Färbung

Die DNS-Strangbrüche, die durch Endonukleaseaktivität in apoptotischen Zellen entstehen, lassen sich mit der TUNEL-Färbung darstellen. Die Zahl TUNEL-positiver kortikaler Neurone stieg signifikant bei Apoptose-Induktion mit Staurosporin oder AF64A an. Es zeigten sich in der Färbung jedoch keine signifikanten Unterschiede in den exzitotoxisch-nekrotischen Modellen wie OGD oder Glutamat gegenüber den Kontrollkulturen. In den Kontrollkulturen finden sich auch immer wieder TUNEL-

positive Zellen, da ein Teil der Zellen in dieser Art Primärkulturen physiologischerweise apoptotisch wird.

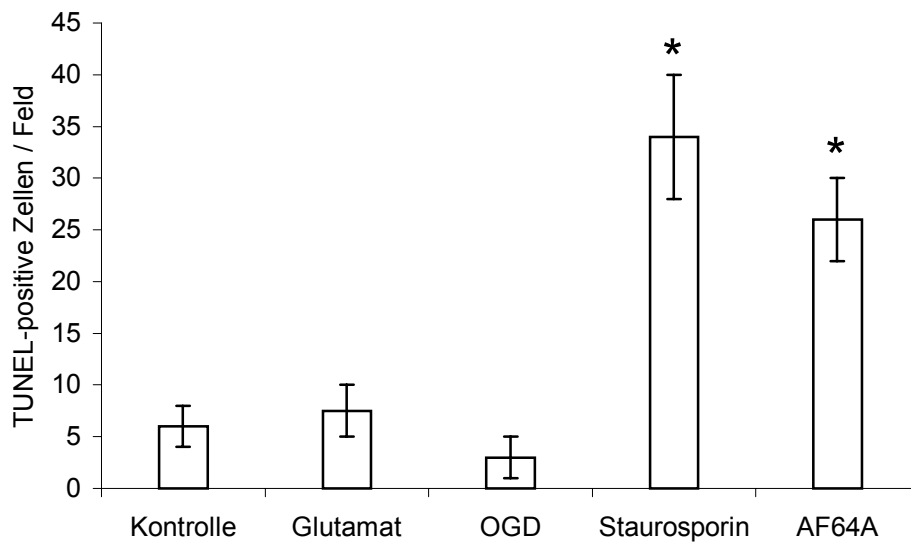


Abb. 11: TUNEL-positive Zellen in den unterschiedlichen Schadensmodellen. Die kortikalen Kulturen wurden entweder mit 100 μ M Glutamat für 30 Minuten (Färbung nach 24 h), OGD (Färbung nach 24 h), 300 nM Staurosporin (Färbung nach 24 h) oder 40 μ M AF64A (Färbung nach 48 h) behandelt. 20 hochauflösende Felder wurden verblindet ausgezählt (400 x Vergrößerung). Zwei unabhängige Experimente mit jeweils drei Glasplättchen pro Experiment wurden gefärbt. * $p < 0,05$ versus Kontrolle.

4.2.3 Analyse der α -Fodrin-spaltprodukte

Das Auftreten von α -Fodrin-spaltprodukten wurde als ein Marker für Caspase- oder Calpainaktivierung in den verschiedenen Schadensmodellen untersucht. Ein 150 kDa-Fragment entsteht bei Proteolyse sowohl durch Calpain- als auch durch Caspaseaktivierung. Die Unterscheidung von Apoptose und Nekrose erfolgt durch das apoptosespezifische 120 kDa-Fragment, das im Rahmen der Apoptose durch Caspase-3 abgespalten wird, nicht aber bei der Nekrose nachweisbar ist (Nath et al., 1996; Wang, 2000). Ein bemerkenswerter Anstieg der 120 kDa-Bande wurde bei Staurosporin (300 nM) schon nach 24 h beobachtet. Zeitabhängig stieg die Bandenintensität auch bei AF64A nach 48 und 72 h. Ein wesentlicher Anstieg der apoptose-spezifischen 120 kDa-Bande liess sich bei den vorwiegend exzitotoxischen Modellen (Glutamat und OGD) nicht beobachten (siehe Abb.12):

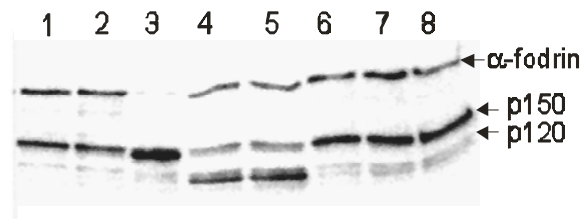
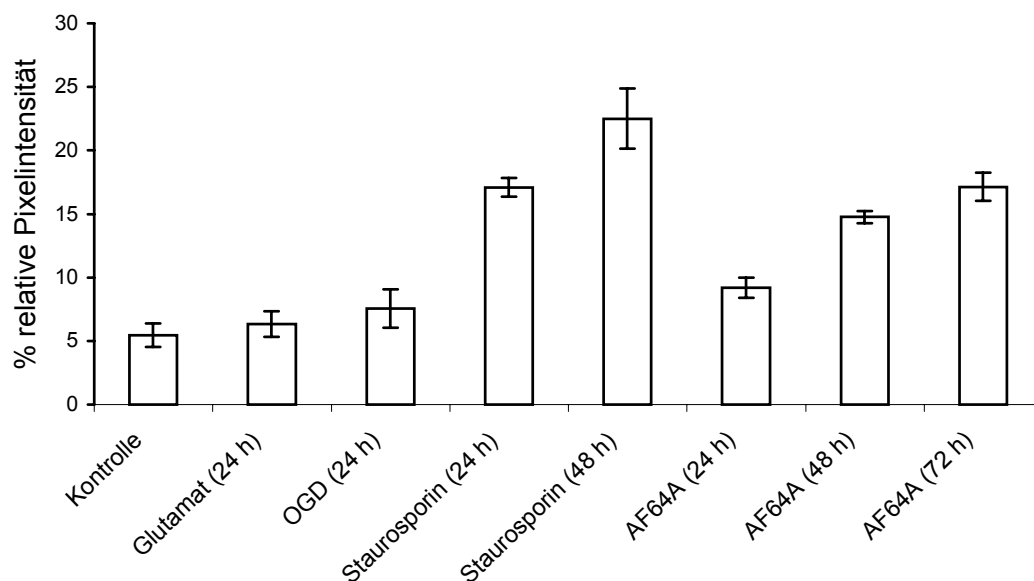
A**B**

Abb. 12: Das Muster der α -Fodrin spaltprodukte als Marker für Calpain- und Caspaseaktivierung in den unterschiedlichen Schadensmodellen. Die Zellen wurden für den Western-blot nach 24, 48 und 72 h geerntet. **A:** Western-blot-Darstellung von α -Fodrin und seiner Spaltprodukte p150 und p120. Die Spalten entsprechen: 1: Vehikel-behandelte Kontrollkulturen; 2: Glutamat (100 μ M), 24 h nach Behandlung; 3: OGD (circa 135 Min.), 24 h nach Behandlung; 4: Staurosporin (300 nM), 24 h nach Behandlung; 5: Staurosporin (300 nM), 48 h nach Behandlung; 6: AF64A (40 μ M), 24 h nach Behandlung; 7: AF64A (40 μ M), 48 h nach Behandlung; 8: AF64A (40 μ M), 72 h nach Behandlung. **B:** Die semiquantitative Analyse der 120 kDa-Bande (p120) mit Densitometrie erfolgte von drei separaten Experimenten.

4.3 Effekte von Melatonin in den unterschiedlichen Schadens-modellen

4.3.1 Eigenwirkung von Melatonin in nativen, neuronalen Primärkulturen

Die Einmalgabe von Melatonin (0,01 – 0,5 mM) in kortikalen Kulturen am 10. – 14. DIV verursachte einen signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität im Medium nach 72 h verglichen mit Vehikel-behandelten Kulturen. Dieser Anstieg der LDH-Aktivität war

nach 24 h nicht vorhanden, begann nach 48 h und erreichte sein Maximum nach 72 h (Tabelle 2).

Tabelle 2: Veränderung der LDH-Freisetzung nach 24, 48 und 72 h in nativen, kortikalen Primärkulturen nach einmaliger Melatoningabe (10 – 500 µM). n = 4 – 16, * p < 0,05 versus Vehikel-behandelte Kulturen; one-way ANOVA gefolgt von Tuckey's posthoc-Test. LDH-Aktivitäten in Units / ml Medium.

Zeit nach Melatoningabe	Vehikel	Melatonin			
		10 µM	50 µM	100 µM	500 µM
24 h	27,0 ± 2,3	20,8 ± 2,2	28,6 ± 2,1	28,0 ± 1,6	28,6 ± 2,0
48 h	35,7 ± 3,5	29,0 ± 2,2	32,0 ± 3,4	39,1 ± 5,8	41,6 ± 3,7
72 h	33,5 ± 2,7	39,4 ± 2,1	44,2 ± 1,4*	34,6 ± 2,3	56,0 ± 1,8*

Die Schädigung der Zellmembranintegrität als Ursache des LDH-Anstiegs lässt sich nicht auf die Zugabe kleiner Mengen von Alkohol zurückführen, da die vehikel-behandelten Zellen mit gleichen Mengen von Alkohol behandelt wurden (0,01% Ethanol im Medium). Ein weiterer Hinweis für diese Schädigung war ein dosisabhängiger Anstieg der Malondialdehyd-Konzentration nach Melatoningaben von 0,5 – 2,0 mM. Dieser Marker für abgelaufene Lipidperoxidationen war nach 24 h erhöht (Abb. 13). Zum Vergleich wurden zwei weitere Antioxidantien (DMTU und PBN) untersucht. Im Gegensatz zu Melatonin führten weder DMTU noch PBN zu einem Anstieg der LDH-Freisetzung ins Medium (Tabelle 3).

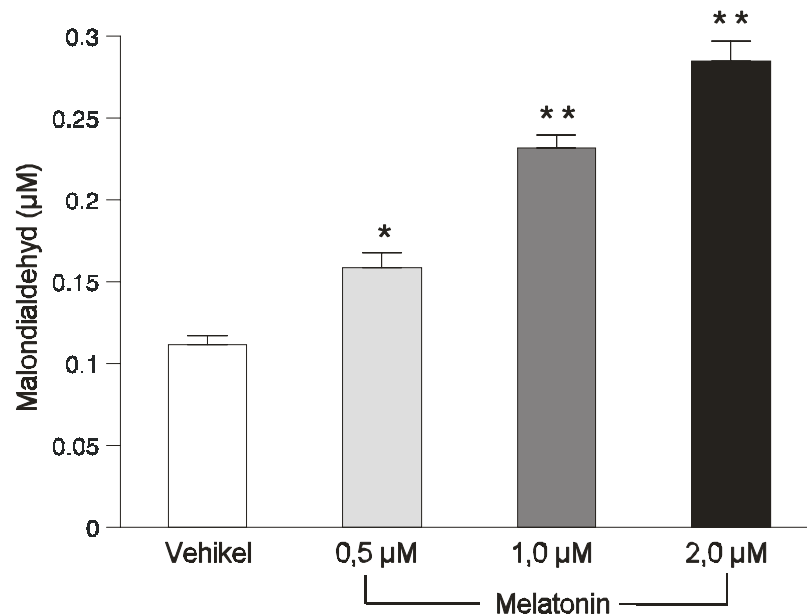


Abb. 13: Anstieg der Malondialdehyd-Konzentration durch Melatonin in nativen, kortikalen Zellkulturen. Am 10. DIV wurden die Zellen mit Vehikel oder 0,5, 1,0 oder 2,0 mM Melatonin behandelt. Die Zellen wurden nach 24 h Melatoninexposition geerntet. $n = 4 - 6$ für jede Konzentration, * $p = 0,004$, ** $p < 0,001$ versus Vehikel-behandelte Zellen.

Tabelle 3: Unveränderte LDH-Freisetzung nach 24, 48 und 72 h in nativen, kortikalen Kulturen durch die einmalige Behandlung mit DMTU oder PBN. $n = 4 - 16$.

Zeit nach DMTU-Gabe		DMTU	
	Vehikel	1 mM	10 mM
24 h	$29,3 \pm 4,6$	$31,9 \pm 9,1$	$32,5 \pm 1,3$
48 h	$37,1 \pm 3,2$	$35,6 \pm 3,8$	$43,4 \pm 2,8$
72 h	$39,2 \pm 7,5$	$33,6 \pm 9,5$	$39,5 \pm 6,9$
Zeit nach PBN-Gabe		PBN	
	Vehikel	0,1 mM	1,0 mM
24 h	$34,2 \pm 3,2$	$37,6 \pm 6,6$	$38,9 \pm 3,1$
48 h	$34,3 \pm 5,8$	$37,6 \pm 6,6$	$42,1 \pm 2,9$
72 h	$40,3 \pm 4,0$	$38,8 \pm 1,3$	$48,0 \pm 5,7$

4.3.2 AF64A und Melatonin

Der durch AF64A ausgelöste LDH-Anstieg konnte durch die Behandlung mit Melatonin (0,1 und 0,5 mM) nicht verhindert werden. Die durch AF64A ausgelöste LDH-Ausschüttung wurde durch Melatonin unerwartet verstärkt. Dies war schon in der niedrigsten Dosis von AF64A erkennbar (Abb. 14). Zusätzlich bestätigte sich, dass Melatonin in der Konzentration von 0,5 mM in den Vehikel-behandelten Schwesterkulturen selbst eine zellschädigende Wirkung ausübte.

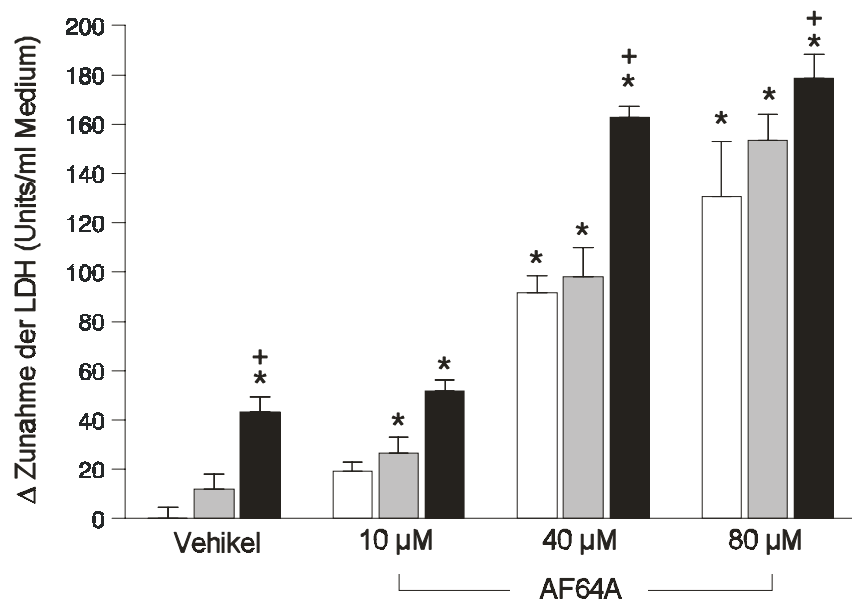


Abb. 14: Wirkung von Melatonin auf die LDH-Ausschüttung durch AF64A in kortikalen Kulturen. Am 10. DIV wurden die Zellen 2 h vor der AF64A-Exposition mit 0,1 und 0,5 mM Melatonin vorbehandelt. Die AF64A (10, 40, 80 μ M)- und Vehikel-Behandlung erfolgte dann für 5 h mit anschließendem Auswaschen mit PBS und Wiedergabe des konditionierten Mediums, das Melatonin oder das Vehikel enthielt. Die LDH-Aktivität im Überstand wurde nach 72 h gemessen. Dargestellt ist hier im Diagramm die Differenz zu den vehikel-behandelten Schwesterkulturen (Kontrollen), die im Mittelwert eine LDH-Aktivität von $61,2 \pm 4,7$ Units / ml Medium besaßen. $n = 4 - 11$ für jede Gruppe, erhoben in 2 unterschiedlichen Experimenten; * $p < 0,001$ versus Vehikel-behandelte Kontrollkulturen; + $p < 0,005$ versus AF64A. □ Vehikel des Melatonins, ■ 0,1 mM Melatonin, ■ 0,5 mM Melatonin.

Auch der Abfall des MTT-Umsatzes als Marker des mitochondrialen Stoffwechsels wurde durch Melatonin nicht verhindert. Der MTT-Assay wurde 72 h nach AF64A-Gabe durchgeführt (Abb. 15).

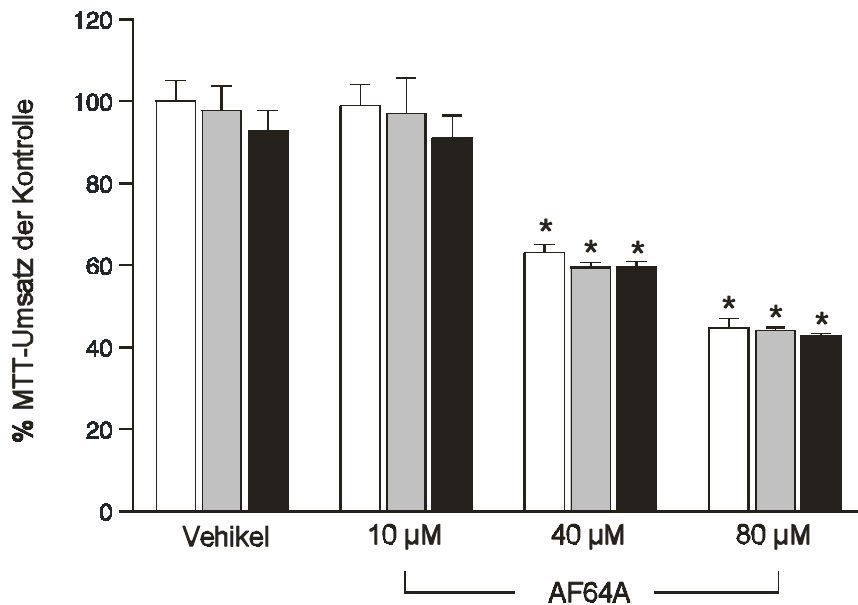


Abb. 15: Melatonineffekt auf den AF64A-induzierten Verlust des MTT-Stoffwechselumsatzes in kortikalen Zellen. Am 10. DIV wurden die Zellen mit 0,1 oder 0,5 mM Melatonin für 2 h vorbehandelt und dann der AF64A-Exposition (10, 40 oder 80 µM) oder dem entsprechenden Vehikel für 5 h ausgesetzt, anschließend mit PBS gewaschen und mit den konditionierten Medien mit den unterschiedlichen Melatonin Dosen oder dem Vehikel versorgt. Der MTT-Stoffwechselumsatz wurde nach 72 h nach der Gabe von AF64A gemessen. Die Daten sind als relativer Prozentanteil der vehikel-behandelten Kontrollen dargestellt (100% Stoffwechselaktivität). Es wurden die Daten aus 2 unterschiedlichen Experimenten gepoolt. n = 4 – 11 für jede Gruppe; * p < 0,001 versus Vehikel-behandelte Kontrollen. □ Vehikel des Melatonins, ■ 0,1 mM Melatonin, ■ 0,5 mM Melatonin.

Wir wollten nun herausfinden, ob AF64A eine Form von Zelltod induziert, bei der oxidativer Stress eine entscheidende Rolle spielt, und, wenn das so ist, testen, ob Melatonin in der Lage ist, diese freien Radikale wegzufangen. Zur Quantifizierung des oxidativen Stresses wurde Malondialdehyd, das Hydrolyseprodukt der Lipidperoxide, gemessen. Die Malondialdehyd-Konzentration gibt indirekt Hinweise auf freie Radikale, da die Lipidperoxidation die Folge oxidativer Schädigung ist.

Die Malondialdehyd-Konzentration stieg 10 h nach Zugabe von AF64A von $0,175 \pm 0,004 \mu\text{M}$ auf $0,195 \pm 0,023 \mu\text{M}$ an, war am höchsten nach 24 h mit $0,245 \pm 0,010 \mu\text{M}$ und nach 48 h mit $0,212 \pm 0,013 \mu\text{M}$ nicht mehr signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Schwesterkulturen. Die Zugabe von Melatonin (0,1 mM) 1h vor der AF64A-Exposition reduzierte den nach 24 h auftretenden Anstieg der Malondialdehyd-Konzentration signifikant (siehe Abb. 16).

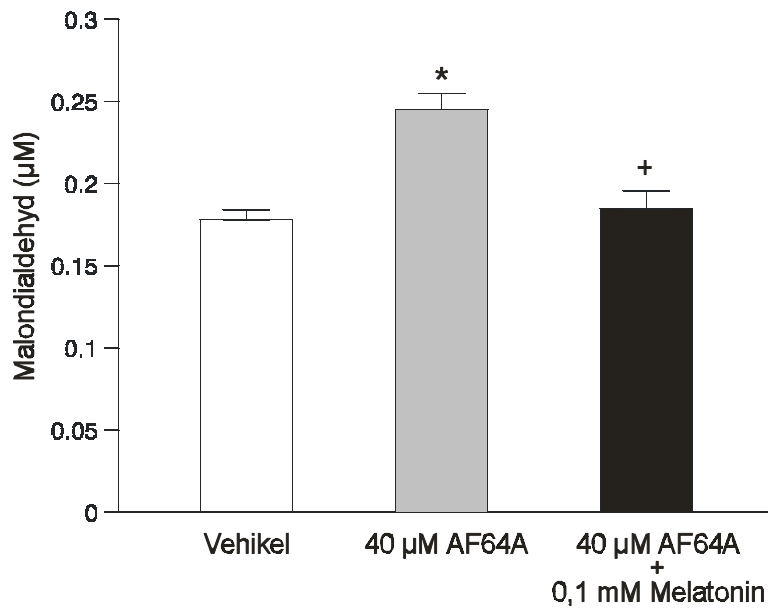


Abb. 16: Melatonin verhinderte den Anstieg der Malondialdehyd-Konzentration durch AF64A in neuronalen Primärkulturen der Ratte. Am 10. – 14. DIV wurden die Zellen 1 h vor 40 μM AF64A-Gabe mit 0,1 mM Melatonin vorbehandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Malondialdehyd-Konzentration bestimmt. n = 6 – 13 für jede Kombination, erhoben aus 2 unterschiedlichen Experimenten; *p < 0,001 versus Vehikel-behandelte Zellen; + p < 0,001 versus AF64A-behandelte Zellen.

4.3.2.1 AF64A und andere antioxidative Substanzen

Um weitere Informationen über die Beteiligung von freien Radikalen bei der Schädigung durch AF64A zu erhalten, haben wir andere antioxidative Substanzen eingesetzt: DMTU und PBN. Im Gegensatz zu Melatonin änderte die alleinige Gabe von DMTU oder PBN die LDH-Aktivität im Medium nicht (siehe oben, Tabelle 3).

Beide Antioxidantien schützten nicht vor dem Zelltod durch AF64A, konnten aber die Bildung von Malondialdehyd wirksam auf das Niveau der Vehikel-behandelten Kulturen reduzieren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Auswirkungen der Antioxidantien Dimethylthiourea (DMTU) und N-tert-Butyl- α -Phenylnitron (PBN) auf die LDH-Aktivität (gemessen nach 72 h) und die Bildung von Malondialdehyd (gemessen nach 24 h) in kortikalen Neuronen nach Behandlung mit 40 μ M AF64A. n = 6 – 8; 3 unabhängige Experimente; * p < 0,001 versus Vehikel.

	Antioxidant	Vehikel	AF64A + Vehikel	AF64A + Antioxidant (niedrige Dosis)	AF64A + Antioxidant (hohe Dosis)
LDH- Freisetzung (U/ml Medium)	PBN (0,1/1,0 mM)	40,3 \pm 4,0	84,4 \pm 5,4 *	84,8 \pm 3,8 *	85,1 \pm 5,4 *
	DMTU (1,0/10,0 mM)	39,2 \pm 7,5	77,0 \pm 5,0 *	76,3 \pm 2,7 *	81,7 \pm 5,4 *
Malon- dialdehyd (nM)	PBN (0,1/1,0 mM)	170 \pm 11	237 \pm 14 *	161 \pm 6	156 \pm 15
	DMTU (1,0/10,0 mM)	170 \pm 11	237 \pm 14 *	140 \pm 12	174 \pm 9

4.3.3 Staurosporin und Melatonin

Die einstündige Vorbehandlung mit 0,1 oder 0,5 mM Melatonin konnte die Zellschädigung durch Staurosporin (100 oder 300 nM) zu keinem der untersuchten Zeitpunkte verhindern (siehe Tabelle 5). Dies konnte sowohl durch den Anstieg der LDH-Freisetzung als auch durch den Abfall des MTT-Umsatzes demonstriert werden. Ähnlich wie beim AF64A-Modell ergaben sich Hinweise für die Potenzierung der neurotoxischen Wirkung von Staurosporin durch Melatonin. So wurde die LDH-Freisetzung nach 24 h Behandlungsdauer mit 100 nM Staurosporin durch die Zugabe von 0,5 mM Melatonin von 85,9 \pm 5,4 auf 103,4 \pm 2,9 signifikant verstärkt.

Tabelle 5: Einfluss von Melatonin auf die durch Staurosporin induzierte Apoptose. Stau = Staurosporin; Mel = Melatonin. Die Ergebnisse aus 2 – 3 unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. n = 8 – 16 für die LDH-Werte und n = 8 für den MTT-Umsatz. * p < 0,001 versus Vehikel; + p < 0,05 versus 100 nM Staurosporin + Vehikel.

LDH-Freisetzung (U / ml Medium)				MTT-Umsatz (% Vehikel)
Zeit nach Behandlung	24 h	48 h	72 h	72 h
Vehikel	60,8 ± 3,3	53,6 ± 3,3	73,0 ± 7,6	100 ± 13,0
100 nM Stau + Vehikel	85,9 ± 5,4 *	103,8 ± 6,0 *	107,2 ± 3,0 *	80,2 ± 15,1
100 nM Stau + 100 µM Mel	92,1 ± 4,8 *	109,9 ± 8,2 *	113,7 ± 8,6 *	79,9 ± 11,6
100 nM Stau + 500 µM Mel	103,4 ± 2,9 * +	117,1 ± 4,2 *	120,2 ± 8,4 *	79,5 ± 11,7
300 nM Stau + Vehikel	122,7 ± 5,0 *	166,8 ± 9,5 *	198,7 ± 11,9 *	44,7 ± 9,8 *
300 nM Stau + 100 µM Mel	123,8 ± 3,9 *	159,8 ± 8,1 *	190,4 ± 16,7 *	40,1 ± 8,4 *
300 nM Stau + 500 µM Mel	140,1 ± 9,4 *	188,4 ± 13,6 *	218,0 ± 14,9 *	36,7 ± 9,4 *

4.3.3.1 Staurosporin und andere antioxidative Substanzen

Die Zellschädigung durch Staurosporin in kortikalen Zellkulturen führte bereits nach 24 h zu einem signifikanten LDH-Anstieg und erreichte nach 48 h ein Maximum (siehe Tabelle 5). Zum Zeitpunkt der maximalen Schädigung wurde der Einfluss der Antioxidantien PBN und DMTU auf die Staurosporin-induzierte LDH-Freisetzung untersucht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Auswirkung der Antioxidantien Dimethylthiourea (DMTU) und N-tert-Butyl- α -Phenylnitron (PBN) auf die LDH-Aktivität und die Bildung von Malondialdehyd in kortikalen Neuronen nach Behandlung mit 300 nM Staurosporin. Malondialdehyd wurde nach 5 h, die LDH-Aktivität 48 h nach Behandlungsbeginn gemessen; n = 8 – 10; * p < 0,001 versus Vehikel.

	Antioxidant	Vehikel	Staurosporin + Vehikel	Staurosporin + Antioxidant (niedrige Dosis)	Staurosporin + Antioxidant (hohe Dosis)
LDH-Frei- setzung (U / ml Medium)	PBN (0,1/1,0 mM)	68,4 \pm 4,4	137,8 \pm 5,2 *	130,8 \pm 5,3 *	146,5 \pm 5,1 *
	DMTU (1,0/10,0 mM)	67,5 \pm 3,9	119,0 \pm 3,5 *	123,2 \pm 4,8 *	127,5 \pm 2,8 *
Malon- dialdehyd (nM)	PBN (0,1/1,0 mM)	98 \pm 6	227 \pm 7 *	91 \pm 5	91 \pm 5
	DMTU (1,0/10,0 mM)	98 \pm 6	227 \pm 7 *	101 \pm 6	95 \pm 7

Auch hier zeigt sich, dass die Antioxidantien die neuronale Zellschädigung durch Staurosporin nicht verhindern konnten. Hingegen waren beide Antioxidantien in der Lage, den 5 h nach Staurosporingabe auftretenden Anstieg von Malondialdehyd zu blockieren.

4.3.4 OGD und Melatonin

Eine zweistündige OGD führte in unseren kortikalen Kulturen zu einer LDH-Freisetzung, die annähernd vergleichbar war mit der vollständigen Zellschädigung, die nach einer exzessiven Glutamatdosis (5 mM, „totaler Zelltod“) zu beobachten war. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass 0,5 mM Melatonin diese Zellschädigung signifikant reduzieren konnte, während dieser protektive Effekt in den höheren Dosen nicht mehr nachweisbar war.

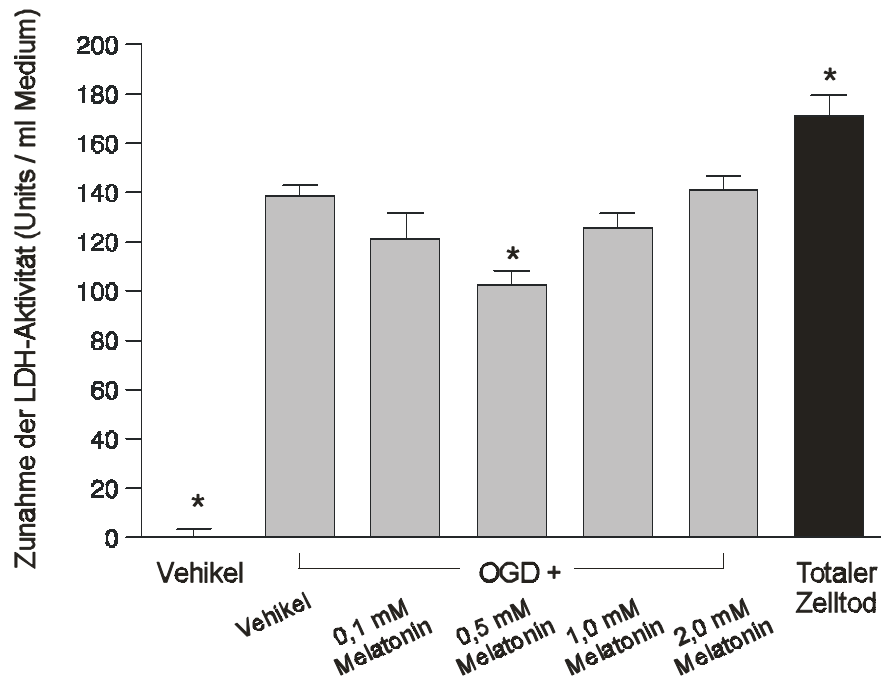


Abb. 16: Abschwächung des durch OGD ausgelösten neuronalen Zelltodes durch Melatonin. Am 14. DIV wurden die Zellen 140 min der OGD ausgesetzt. Melatonin wurde im Konzentrationsbereich von 0,1 – 2 mM den Kulturen über den gesamten Zeitraum zugegeben. Die LDH-Aktivität wurde 24 h nach dem Beginn der OGD gemessen. Der totale Zelltod repräsentiert die freigesetzte LDH-Menge nach kompletter Destruktion der Zellen durch 5 mM Glutamatexposition über 24 h. Die Daten werden als Zunahme der LDH-Aktivität im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Schwesterkulturen präsentiert. Diese Zellen wurden mit Puffer mit Glukose über 140 Minuten im Brutschrank mit dem Vehikel von Melatonin behandelt und hatten nach 24 h eine LDH-Aktivität von $61,8 \pm 1,7$ Units / ml Medium. $n = 12 - 19$ für jede Kondition. Es wurden die Daten aus 2 unterschiedlichen Experimenten zusammengefaßt. * $p < 0,05$ versus OGD + Vehikel.

4.3.5 OGD mit MK-801 und Melatonin

Um zu differenzieren, ob die neuroprotektive Wirkung von Melatonin im OGD-Modell auf den exzitotoxisch-nekrotischen oder den apoptotischen Anteil zurückzuführen ist, wurden die neuronalen Zellkulturen zur Ausschaltung des nekrotischen Anteils mit MK-801, einem Glutamatantagonisten des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor), behandelt. Der NMDA-Rezeptor spielt bei der Vermittlung der exzitotoxischen Anteile des Zelltodes bei der OGD eine entscheidende Rolle (Gotttron et al., 1997).

Tabelle 7: Wirksamkeit von MK-801 (10 μ M) oder Melatonin (0,5 mM) auf die LDH-Freisetzung (Units / ml Medium), 24 h und 48 h nach 120-minütiger OGD. n = 5-8; * p < 0,05 versus OGD + Vehikel.

	Vehikel	OGD + Vehikel	OGD + 500 μ M Melatonin	OGD + 10 μ M MK-801
24 h	53,5 \pm 3,4	225,2 \pm 6,0	187,7 \pm 4,1 *	123,3 \pm 6,9 *
48 h	65,0 \pm 7,6	270,8 \pm 6,6	220,7 \pm 4,2 *	175,3 \pm 7,6 *

MK-801 reduzierte in einer 120 minütigen Hypoxie die LDH-Freisetzung auf 40,6 \pm 4,0 % und 53,6 \pm 3,7 % 24 h und 48 h nach der Hypoxie. Melatonin (0,5 mM) konnte die LDH-Freisetzung nach 24 h und 48 h hingegen nur auf 78,2 \pm 7,9 % und 75,7 \pm 2,0 % reduzieren (siehe Tabelle 7).

Bei einer Hypoxiezeit von 180 Minuten war MK-801 weniger wirksam (Verringerung der LDH-Freisetzung auf 79,5 \pm 4,1 %, jeweils nach 24 h und 48 h gemessen). Eine zusätzliche Gabe von Melatonin (0,1 und 0,5 mM) brachte keine weitere Neuroprotektion. Im Gegensatz dazu konnten wir mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK eine weitere Reduktion der LDH-Freisetzung auf 63,7 \pm 3,1 % und 64,0 \pm 1,9 % erzielen (Abb. 17).

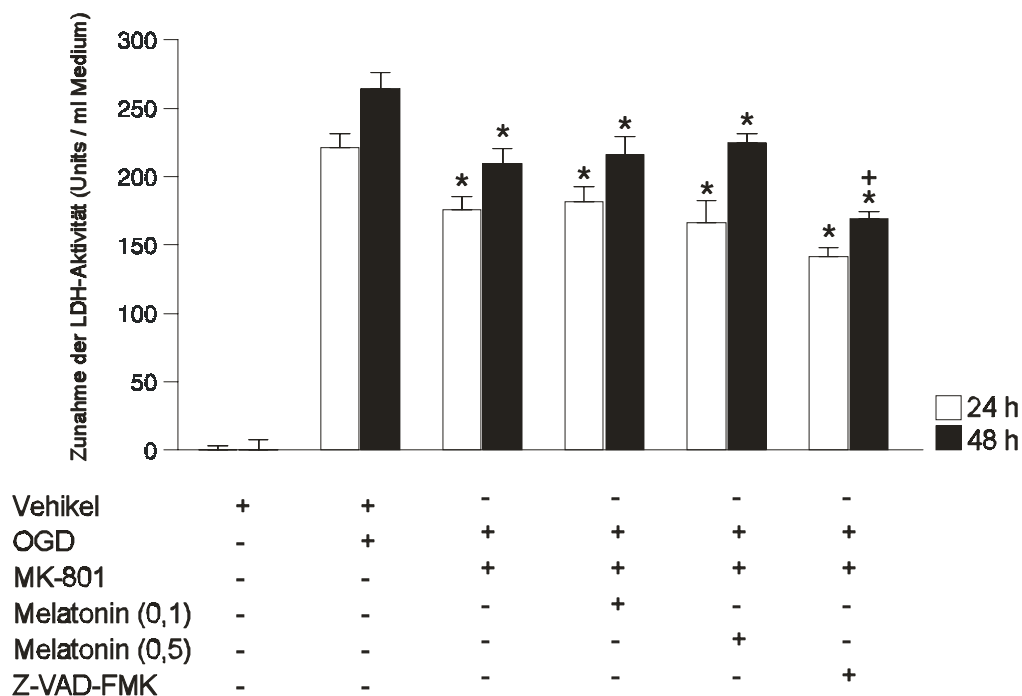


Abb. 17: Melatonin zeigte keine Wirkung auf die apoptotische Komponente der OGD, die durch den Glutamatantagonisten MK-801 demaskiert wurde. Am 10. DIV wurden die Zellen 180 min der OGD ausgesetzt. Melatonin (0,1 und 0,5 mM) und MK-801 (10 μ M) wurden 60 und 30 min vor Beginn der OGD zugegeben. Die OGD wurde von 120 auf 180 min verlängert um einen neuronalen Zelltod in Anwesenheit des Glutamatantagonisten MK-801 zu erreichen, der ungefähr vergleichbar zu der Zellschädigung bei 120-minütiger OGD ohne Glutamatantagonisten war. Z-VAD-FMK wurde zu Beginn der Reoxygenierungsphase und 24 h später zugegeben. Die LDH-Aktivität wurde 24 und 48 h nach der OGD gemessen. Die Daten wurden als Zunahme der LDH-Aktivität im Vergleich zu vehikel-behandelten Kontrollkulturen angegeben. Die Aktivität der LDH in den Kontrollkulturen war $53,5 \pm 3,4$ und $65,5 \pm 7,6$ Units / ml Medium nach 24 und 48 h. n = 5 – 8 für jede Kondition; * p < 0,05 versus OGD + Vehikel; + p < 0,05 versus OGD + MK-801.

4.4 Effekt von 17 β -Estradiol in den unterschiedlichen Schadensmodellen

4.4.1 AF64A und 17 β -Estradiol

Die Langzeitvorbehandlung für 20 h mit einer Einzeldosis 17 β -Estradiol vor der AF64A-Behandlung war mit einer markanten LDH-Abnahme nach 72 h in hippokampalen und septalen Kulturen verbunden (Abb. 18).

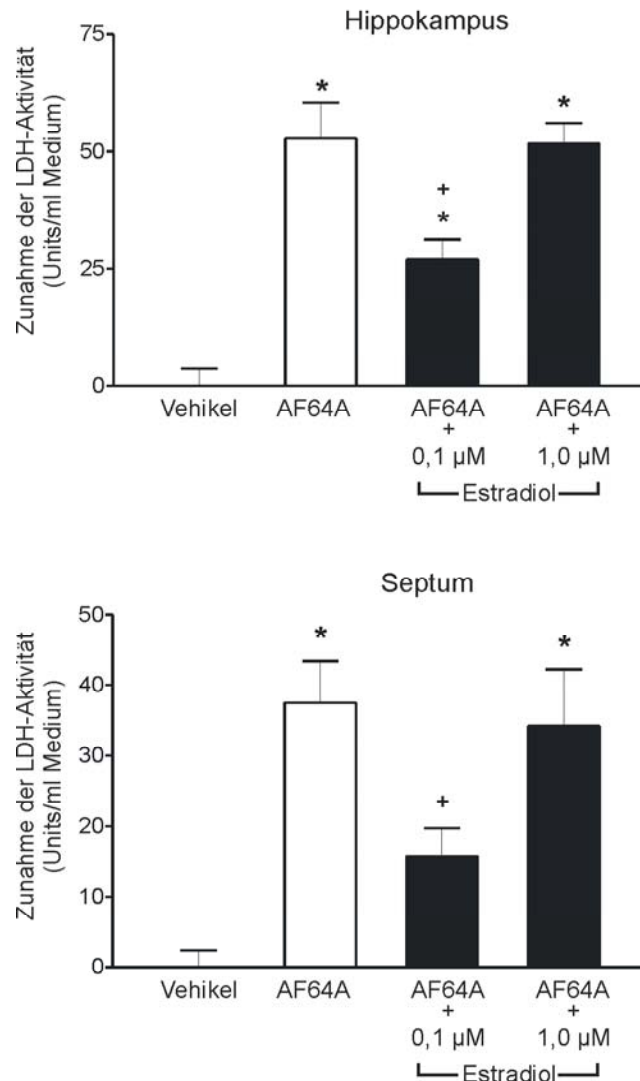


Abb. 18: Wirkung von 17 β -Estradiol auf die LDH-Freisetzung nach AF64A in hippokampalen und septalen Kulturen. Am 10. DIV wurden die Zellen mit 0,1 oder 1,0 μ M 17 β -Estradiol 20 h vorbehandelt. Nach dieser Zeit erfolgte die Gabe von AF64A oder korrespondierendem Vehikel. Die LDH-Freisetzung wurde im Medium 72 h nach Behandlung mit AF64A gemessen. Hier werden die Daten als Zunahme der LDH-Aktivität gegenüber den Vehikel-behandelten Kontrollkulturen gezeigt. Die LDH-Aktivität der hippokampalen Kontrollen betrug $38,5 \pm 3,7$, die der septalen Kontrollen $34,1 \pm 2,4$ Units /ml Medium. Es wurden Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten gepoolt, $n = 5 - 10$ für jede Kondition; * $p < 0,004$ versus vehikel-behandelte Kulturen; + $p < 0,05$ versus AF64A.

Die neuroprotektive Wirksamkeit von 17 β -Estradiol wurde in den septalen und hippokampalen Neuronen nur in der niedrigeren Dosis von 0,1 μ M erreicht, erschien aber nicht in der höheren Dosis von 1,0 μ M. Wir beobachteten auch keine Neuroprotektion in kortikalen Kulturen. So veränderte sich der AF64A-verursachte Anstieg der LDH-Aktivität in kortikalen Neuronen ($90,4 \pm 9,3$ U / ml) weder nach der Vorbehandlung mit 0,1 μ M ($80,8 \pm 11,9$) noch mit 1,0 μ M 17 β -Estradiol ($96,9 \pm 8,8$). Die Kurz-

zeitbehandlung mit verschiedenen Estradioldosen 1 h vor der AF64A-Gabe führte nicht zu einer signifikanten Reduktion der LDH-Freisetzung nach 72 h Toxinexposition. Ein neuroprotektive Effekt der Kurzzeitbehandlung war in den Kulturen aus allen drei Regionen Septum, Hippokampus und Kortex nicht nachweisbar (Tabelle 8):

Tabelle 8: Fehlender Einfluss der Kurzzeitbehandlung (1 h) mit 17 β -Estradiol auf die LDH-Freisetzung (Δ U / ml Medium) in hippokampalen, septalen und kortikalen primären, neuronalen Kulturen nach 72 h Behandlung mit AF64A (40 μ M). n = 9 – 12; Die LDH-Freisetzung in den Kontrollkulturen war $56,3 \pm 3,4$ in hippokampalen, $27,0 \pm 2,5$ in septalen und $55,5 \pm 5,8$ U / ml Medium in kortikalen Kulturen; * p < 0,01 versus korrespondierende Kontrollkulturen.

Neuronale Primärkulturen	AF64A + Vehikel	AF64A + 0,1 μ M Estradiol	AF64A + 1,0 μ M Estradiol
Hippokampus	$140,0 \pm 8,8$ *	$148,7 \pm 11,6$ *	$151,3 \pm 5,7$ *
Septum	$29,8 \pm 3,6$ *	$27,0 \pm 4,5$ *	$21,1 \pm 3,6$ *
Kortex	$93,1 \pm 10,9$ *	$91,0 \pm 10,5$ *	$102,4 \pm 10,0$ *

In Abb. 19 a-c sind repräsentative Phasenkontrastaufnahmen primärer neuronaler Kulturen aus Hippokampus unter Kontrollbedingungen und nach AF64A-Behandlung mit und ohne Langzeitbehandlung mit 17 β -Estradiol dargestellt. AF64A führte zu den morphologischen Zeichen der Apoptose, wie Degeneration der Neuriten, Schrumpfung der Zellkörper und Aufsplitterung in kondensierte Partikel, die teilweise durch 17 β -Estradiol verhindert werden konnten.

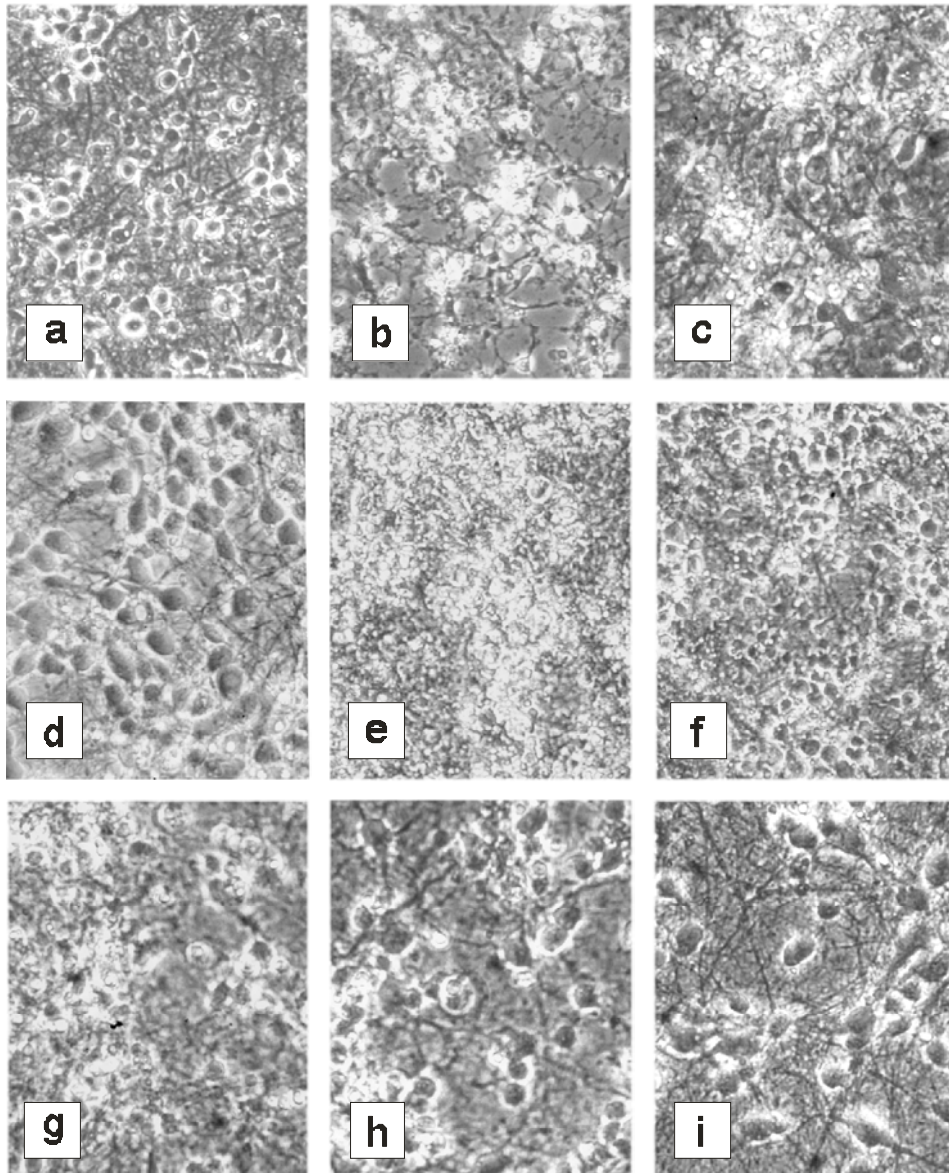


Abb. 19: Phasenkontrast-Mikroskopiebilder primärer neuronaler Zellkulturen nach den verschiedenen Schädigungsmodellen mit und ohne Vorbehandlung mit 17 β -Estradiol (Vergrößerung x250). a-c: Effekt der Langzeitvorbehandlung (20 h) mit 17 β -Estradiol auf das morphologische Bild hippokampaler Kulturen 72 h nach AF64A-Behandlung. a: Vehikel-behandelte Kontrollen; b: AF64A-behandelte Kulturen (40 μ M); c: AF64A-behandelte Kulturen mit 20-stündiger Vorbehandlung mit 0,1 μ M 17 β -Estradiol. d-i: Effekt der Kurzzeitbehandlung (1 h) mit 17 β -Estradiol auf das morphologische Bild des neuronalen Zelltods 24 h nach Schädigung durch das Glutamat- oder OGD-Modell in kortikalen Neuronen. d: Vehikel-behandelte Kontrollkulturen; e: Kortikale Kulturen nach Glutamatexposition (100 μ M); f: Glutamatbehandlung 1 h nach der Vorbehandlung mit 10,0 μ M 17 β -Estradiol; g: Kortikale Kulturen 24 h nach OGD-Behandlung; h: OGD-Exposition nach 1 h Vorbehandlung mit 0,1 μ M 17 β -Estradiol; i: OGD-Exposition nach 1 h Vorbehandlung mit 0,5 μ M 17 β -Estradiol.

4.4.2 Staurosporin und 17 β -Estradiol

Bei der durch Staurosporin initiierten Apoptose waren weder die Kurz- (1 h) noch die Langzeitvorbehandlung (20 h) mit 0,1 und 1,0 μ M Estradiol in der Lage, die Zellschädigung wirksam zu verhindern. Das Ausbleiben der Neuroprotektion trat in septalen, hippocampalen und kortikalen Kulturen gleichermaßen auf. In Tabelle 9 sind beispielhaft die LDH-Daten für Hippokampus und Kortex aufgelistet:

Tabelle 9: Auswirkung von Kurz- und Langzeitvorbehandlung (1 h und 20 h) mit 17 β -Estradiol in hippocampalen und kortikalen Kulturen 48 h nach der Gabe von Staurosporin (300 nM). * $p < 0,05$ versus Vehikel-behandelte Schwesterkulturen.

Estradiol-behandlung	Neuronale Primärkulturen	Vehikel	Staurosporin + Vehikel	Staurosporin + 0,1 μ M Estradiol	Staurosporin + 1,0 μ M Estradiol
1 h vorher	Hippokampus	77,2 \pm 5,2	128,6 \pm 8,2 *	138,7 \pm 3,0 *	132,8 \pm 6,0 *
	Kortex	66,5 \pm 6,8	119,2 \pm 5,1 *	121,9 \pm 7,3 *	116,2 \pm 11,3 *
20 h vorher	Hippokampus	77,2 \pm 5,2	128,6 \pm 8,2 *	136,2 \pm 11,8 *	153,9 \pm 7,9 *
	Kortex	66,5 \pm 6,8	119,2 \pm 5,1 *	130,6 \pm 9,6 *	126,3 \pm 6,7 *

4.4.3 Glutamat und 17 β -Estradiol

Die Behandlung kortikaler Neurone mit 100 μ M Glutamat für 30 Minuten führte zu massiver Zellschädigung, die mit einer markanten LDH-Freisetzung nach 24 h verbunden war. Die Kurzzeitvorbehandlung mit verschiedenen Estradioldosen 1 h vor der Glutamatgabe verminderte die LDH-Freisetzung. Die Neuroprotektion war signifikant mit 0,1 und 1,0 μ M, wurde aber schwächer bei noch höheren Dosen.

In den Phasenkontrastaufnahmen war der neuroprotektive Effekt klar sichtbar (Abbildung 19, e-f). Keine Neuroprotektion wurde mit der Langzeitbehandlung (20 h) mit 17 β -Estradiol erreicht, während im gleichen Versuch in kurzzeitbehandelten Schwesterkulturen der LDH-Anstieg signifikant verringert wurde (Tabelle 10).

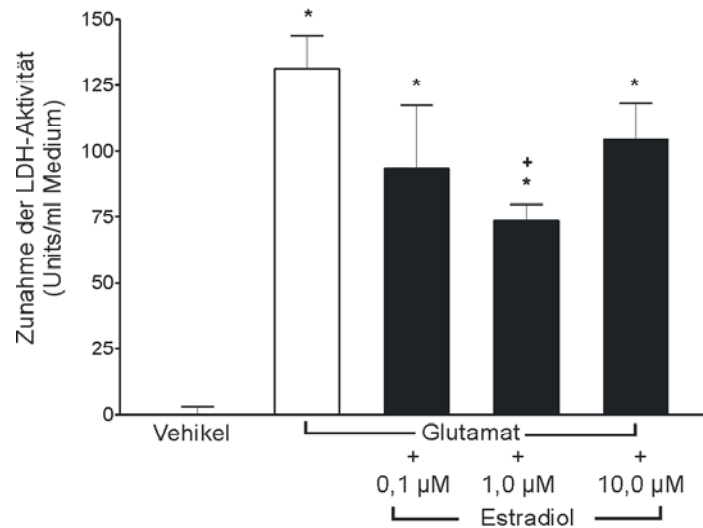


Abb. 20: Wirkung von 17 β -Estradiol auf die neuronale Schädigung durch Glutamat in kortikalen Kulturen. Am 10. DIV wurden die Zellen mit 0,1 – 10 μ M 17 β -Estradiol für 1 h vorbehandelt und dann Glutamat (100 μ M) oder das korrespondierende Vehikel zugegeben. Die LDH-Freisetzung in das Medium wurde nach 24 h untersucht. Die Daten werden als Zunahme der LDH-Aktivität gegenüber den Kontrollkulturen ($63,8 \pm 1,2$) gezeigt. $n = 6 - 8$, zusammengefaßt aus zwei unabhängigen Experimenten; * $p < 0,001$ versus Vehikel-behandelte Kontrollkulturen; ⁺ $p < 0,005$ versus Glutamat.

Tabelle 10: Effekt der Kurzzeit- und Langzeitbehandlung (1 h und 20 h vorher) mit 17 β -Estradiol auf die LDH-Freisetzung (Δ in U / ml Medium) in kortikalen und hippokampalen Kulturen 24 h nach der Glutamatgabe (100 μ M). n = 4 – 24; Die LDH-Freisetzung in vehikel-behandelten Schwesterkulturen war $61,5 \pm 5,0$ (1 h) und $54,8 \pm 4,9$ U / ml Medium (20 h); * p < 0,001 versus Vehikel-behandelte Kulturen; + p < 0,05 versus Glutamat + Vehikel; n.d. = nicht durchgeführt.

Estradiol-Behandlung	Neuronale Primärkultur	Glutamat + Vehikel	Glutamat + 0,1 μ M Estradiol	Glutamat + 1,0 μ M Estradiol	Glutamat + 1,0 μ M Estradiol + 1,0 μ M Tamoxifen	Glutamat + 1,0 μ M Tamoxifen
1 h	Kortex	$76,1 \pm 2,9$ *	$45,4 \pm 2,8$ * ⁺	$43,7 \pm 5,2$ * ⁺	$48,6 \pm 7,1$ * ⁺	$66,0 \pm 5,5$ *
20 h	Kortex	$74,2 \pm 4,3$ *	$67,8 \pm 5,4$ *	$68,1 \pm 3,7$ *	n.d.	n.d.
	Hippokampus	$50,7 \pm 2,7$ *	$42,0 \pm 4,9$ *	$45,8 \pm 2,7$ *	n.d.	n.d.

4.4.4 OGD und 17 β -Estradiol

Die neuroprotektive Wirksamkeit von Estradiol gegen die Schädigung durch die OGD war nur bei der Kurzzeitvorbehandlung (1 h) nachweisbar und vergleichbar mit dem Schutz gegen Glutamattoxizität. Der beste Effekt trat im Dosisbereich von 0,5 – 1,0 μ M Estradiol auf (siehe Abbildung 21).

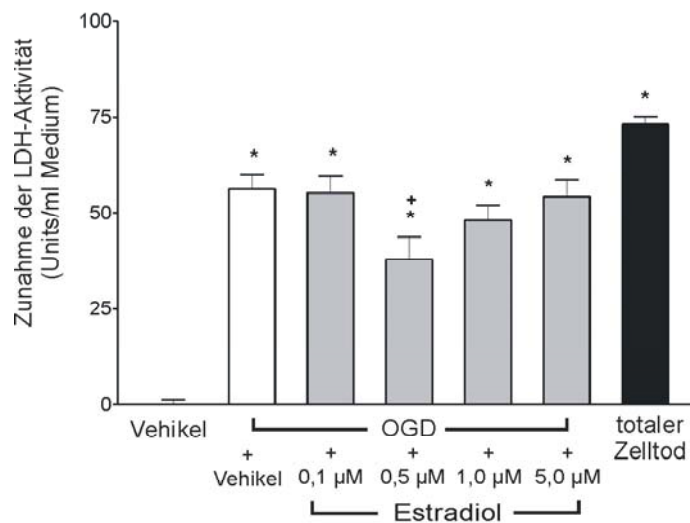


Abb. 21: Effekt von 17 β -Estradiol auf die LDH-Freisetzung nach OGD in kortikalen Neuronen. Es wurde 1 h vor der OGD mit 0,1, 0,5, 1,0 oder 5,0 μ M 17 β -Estradiol am 10. DIV vorbehandelt und die LDH-Aktivität nach 24 h gemessen. Es werden die Zunahme der LDH-Aktivitäten gegenüber den Kontrollkulturen ($63,8 \pm 1,2$) gezeigt. $n = 9 - 24$ für jede Kondition, gepoolt aus zwei verschiedenen Experimenten; * $p < 0,001$ versus Vehikel-behandelte Kontrollkulturen; + $p < 0,05$ versus OGD + Vehikel.

In den Phasenkontrastaufnahmen schienen die Neuronen bei der Gabe von 0,5 μ M 17 β -Estradiol gegen die Hypoxie resistent zu sein und zeigten morphologisch im nativen Bild kaum Zeichen der Zellschädigung (Abbildung 19, g – i). Bei der Konzentration von 0,1 μ M 17 β -Estradiol wurde der LDH-Anstieg im Überstand nicht abgeschwächt, obwohl diese Dosis im Modell für die apoptotische Degeneration sehr effektiv war. Bei der Langzeitvorbehandlung mit Estradiol war kein Schutz gegen OGD zu erzielen. Der durch die OGD ausgelöste Anstieg der LDH-Aktivität in kortikalen Neuronen von $59,7 \pm 7,0$ U / ml Medium wurde durch die Langzeitvorbehandlung mit 0,1 μ M ($56,1 \pm 3,7$), 0,5 μ M ($64,5 \pm 7,5$) oder 1,0 μ M 17 β -Estradiol ($60,5 \pm 4,8$) nicht beeinflusst.

4.5 Rezeptor-abhängige und unabhängige neuroprotektive Wirkungen von 17 β -Estradiol

Zum Nachweis eines rezeptorabhängigen, transkriptions-regulierten Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Estradiol bei Langzeitvorbehandlung wurden die Kulturen zusätzlich mit dem Estrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen und ICI 182,780, bzw. dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid behandelt. Die neuroprotektive Wirkung von 17 β -Estradiol auf den durch AF64A ausgelösten apoptotischen Zelltod wurde sowohl durch die Rezeptorblockade als auch durch Proteinsynthesehemmung antagonisiert. Die Ergebnisse der LDH-Messung zu diesem Experiment sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Verlust der neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Estradiol auf den Zelltod durch 40 μ M AF64A in hippokampalen und septalen Zellen nach Vorbehandlung mit Tamoxifen, ICI 182,780 Cycloheximid (LDH-Anstieg in Δ Units / ml Medium, 48 h post). Die basale LDH-Ausschüttung in den korrespondierenden Kontrollkulturen war $43,3 \pm 4,9$ für die hippokampalen Zellen und $41,7 \pm 3,2$ Units/ml medium für die Zellkulturen aus dem Septum. n = 4 – 9. ^a p < 0,05 und ^b p < 0,001 versus AF64A + Vehikel; ^c p < 0,05 und ^d p < 0,001 versus AF64A + Estradiol.

	Zellkultur	AF64A + Vehikel	AF64A + Antagonist oder Inhibitor	AF64A + Estradiol 0.1 μ M	AF64A + Estradiol + Antagonist oder Inhibitor
Tamoxifen 1 μ M	Hippokampus	41,9 \pm 4,7	36,5 \pm 4,1	21,0 \pm 3,3 ^a	44,8 \pm 6,2 ^c
ICI 182,780 1 μ M	Hippokampus	65,5 \pm 4,8	66,6 \pm 3,8	31,8 \pm 3,0 ^b	68,7 \pm 3,5 ^d
	Septum	49,4 \pm 5,5	43,9 \pm 1,9	24,9 \pm 3,4 ^a	50,7 \pm 2,6 ^d
Cycloheximid 500 ng / ml	Hippokampus	53,6 \pm 4,2	54,5 \pm 5,2	31,4 \pm 3,4 ^a	52,5 \pm 4,2 ^c

Tamoxifen, das eine vergleichbare Affinität für Estrogenrezeptor- α und Estrogenrezeptor- β aufweist (7 versus 6; siehe Kuiper et al., 1997) war jedoch bei einer durch Glutamat ausgelösten Zellschädigung nicht in der Lage, die

Neuroprotektion durch eine Kurzzeitbehandlung mit 17 β -Estradiol zu antagonisieren (Tabelle 11).

4.6 Modulation der Expression von Bcl-2, Bcl-x_L und Bax durch 17 β -Estradiol in hippocampalen und kortikalen Kulturen

In den hippocampalen Kulturen führte die Behandlung mit 30 und 100 nM 17 β -Estradiol zu einer Steigerung der Bcl-2-Level nach 24 und 48 h.

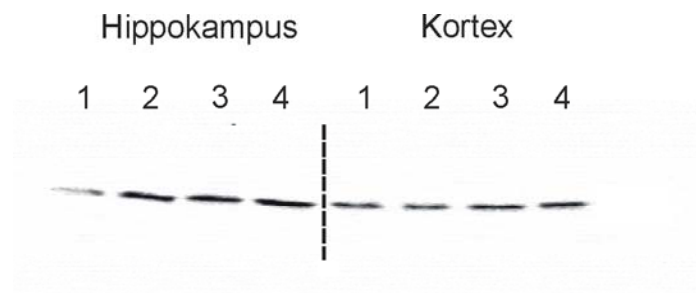


Abb. 22: Die Auswirkung von 17 β -Estradiol (0,03 und 0,10 μ M) auf die Expression von Bcl-2 in hippocampalen und kortikalen Kulturen. Die neuronalen Zellen wurden mindestens 10 Tage in vitro kultiviert bevor sie 24 – 48 h mit 17 β -Estradiol (30 oder 100 nM) behandelt wurden und mit Western-blots untersucht wurden. 1, Vehikel-behandelte Kulturen; 2, 24 h-Behandlung mit 100 nM 17 β -Estradiol; 3, 48 h-Behandlung mit 100nM 17 β -Estradiol 4, 48 h-Behandlung mit 30nM 17 β -Estradiol.

Diese erhöhten Bcl-2-Spiegel persistierten bis zu 68 h nach Einmalgabe von 17 β -Estradiol (siehe Abb. 23).

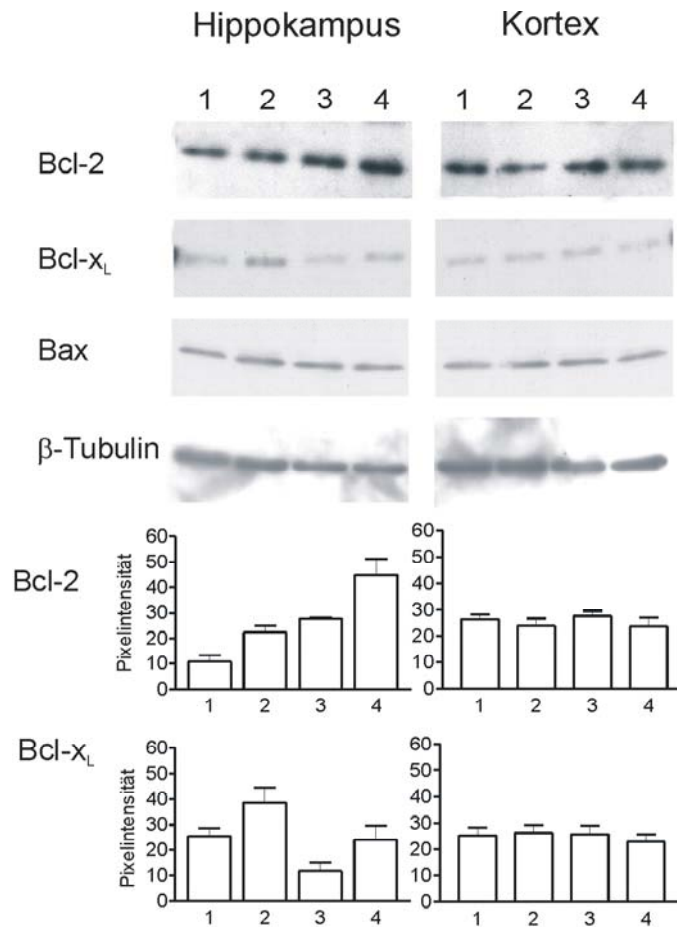


Abb. 23: Der Einfluss von 17 β -Estradiol (100 nM) auf die Expressionsmuster von Bcl-2, Bcl-x_L, Bax und β -Tubulin in Kulturen aus Hippokampus und Kortex. Die Zellen wurden mit Vehikel oder 17 β -Estradiol behandelt und 20 h später Vehikel oder AF64A appliziert. 48 h nach Gabe von AF64A (also 68 h nach 17 β -Estradiol-Behandlung) wurden die Zellen in Western-blots analysiert. Es wurden immer mindestens drei Experimente durchgeführt und ausgewertet. 1, Vehikel / Vehikel-behandelte Kulturen; 2, 17 β -Estradiol / Vehikel-behandelte Kulturen; 3, Vehikel / AF64A-behandelte Kulturen; 4, 17 β -Estradiol / AF64A-behandelte Kulturen. Die semiquantitative Auswertung der Western-blots durch Bandendichte-Bestimmung wird hier von drei separaten Experimenten als Mittelwert der Bandendichten gezeigt.

Zu diesem späten Zeitpunkt haben wir auch erhöhte Bcl-x_L-Proteinkonzentration beobachtet. In kortikalen Kulturen änderte sich im Gegensatz dazu die Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L durch die Behandlung mit 17 β -Estradiol zu keinem Zeitpunkt.

Ein Anstieg der Bcl-2-Expression trat auch nach 48-stündiger Exposition gegenüber AF64A (40 μ M) in den hippokampalen Kulturen auf. Die Vorbehandlung mit 17 β -Estradiol führte zu einer weiteren synergistischen Zunahme der Bcl-2-Spiegel (siehe Abb. 23). Die Expressionsmuster von Bcl-x_L und Bax wurden durch eine 48-stündige Exposition mit AF64A (40 μ M) nicht beeinflusst. Staurosporin führte nicht zu einer synergistischen Zunahme der Bcl-2-Expression in hippokampalen Neuronen (siehe Abb. 24).

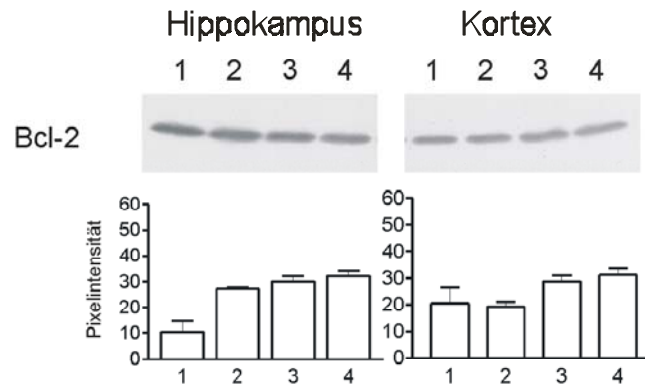


Abb. 24: Wirkung von 17 β -Estradiol (100 nM) und Staurosporin (300 nM) auf die Bcl-2-Level in hippokampalen und kortikalen Kulturen. Die Kulturen aus den beiden Regionen wurden mindestens 10 DIV vor dem Experiment kultiviert. Zunächst wurden die Zellen mit Vehikel oder 17 β -Estradiol behandelt und im nächsten Schritt 20 h später Vehikel oder Staurosporin zugegeben. 1, Vehikel / Vehikel-behandelte Kulturen; 2, 17 β -Estradiol / Vehikel-behandelte Kulturen; 3, Vehikel / Staurosporin-behandelte Kulturen; 4, 17 β -Estradiol / Staurosporin-behandelte Kulturen. Die semiquantitative Auswertung der Western-blots durch Bandendichte-Bestimmung wird hier von 4 separaten Experimenten gezeigt.

Die gesteigerte Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L, die nach der 48-stündigen Behandlung mit 17 β -Estradiol beobachtet werden konnte, wurde sowohl durch Tamoxifen als auch durch Cycloheximid reduziert (siehe Abb. 25).

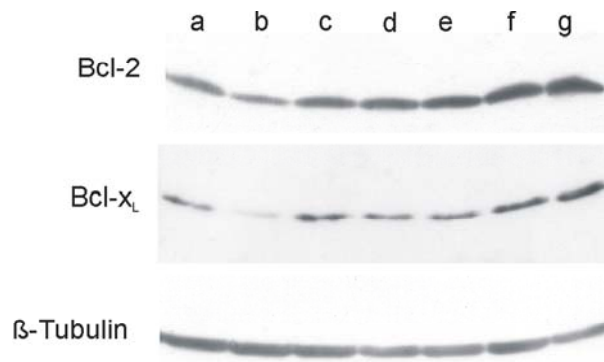


Abb. 25: Antagonismus der Wirkung von 17 β -Estradiol auf die BCL-2- und BCL-x_L-Spiegel in hippokampalen Kulturen durch Cycloheximid und Tamoxifen. Am 10. DIV wurden die Kulturen für 48 h behandelt und dann für Western-blots geerntet. a: Vehikel-behandelte Kulturen, b: Cycloheximid (500 ng/ml Medium), c: Tamoxifen (1,0 μ M), d: 17 β -Estradiol (0,1 μ M) / Cycloheximid (500 ng/ml Medium), e: 17 β -Estradiol (0,1 μ M) / Tamoxifen (1,0 μ M), f: 17 β -Estradiol (0,1 μ M), g: 17 β -Estradiol (1,0 μ M).

4.7 Expression von Estrogenrezeptor- α und - β in septalen, hippocampalen und kortikalen Kulturen

Um herauszufinden, ob die neuroprotektive Wirksamkeit von 17 β -Estradiol gegen AF64A-induzierte Apoptose und der Anstieg der Bcl-Expression von der Präsenz eines spezifischen Estrogenrezeptors abhängt, haben wir die Expression von Estrogenrezeptor- α und Estrogenrezeptor- β in septalen, hippocampalen und kortikalen, neuronalen Kulturen mit immunzytochemischen Techniken untersucht.

4.7.1 Immunzytochemischer Nachweis von Estrogenrezeptor- α

Die immunzytochemische Färbung von Estrogenrezeptor- α war in den kortikalen Kulturen vergleichsweise schwächer als in den hippocampalen und septalen neuronalen Zellkulturen (Abb. 26 A).

Die Intensität der Immunreaktion wurde mittels konfokaler Mikroskopie aus 139 Neuronen der jeweiligen Zellkulturen in randomisierter und verblindeter Weise quantifiziert. Die mittlere Pixel-Intensität war in den septalen Neuronen ($13,06 \pm 0,57$) und hippocampalen Neuronen ($11,37 \pm 0,57$) signifikant höher im Vergleich zu den kortikalen Neuronen ($7,62 \pm 0,47$; $p < 0,05$, one-way ANOVA on ranks mit nachfolgendem Tuckey's post hoc test).

Als weiteres Kriterium zur Differenzierung der Fluoreszenzintensität der Neurone aus den drei Hirnregionen wurde der Median der Pixel-Intensität aller gezählten Zellen (8,9) als Grenze zwischen Zellen „niedriger“ und „hoher“ Intensität gewählt.

In kortikalen Neuronen überwiegen die Zellen niedriger Intensität (100 von 139 Zellen). Eine gegensätzliche Verteilung fand sich in septalen und hippocampalen Nervenzellen (Abb. 26 C).

4.7.2 Immunzytochemischer Nachweis von Estrogenrezeptor- β

Die Immunfärbung gegen Estrogenrezeptor- β war im Unterschied zur Verteilung des α -Estrogenrezeptors in den kortikalen Neuronen wesentlich intensiver als in den septalen und hippocampalen Zellen (Abb. 26 B).

Die Intensität der Immunreaktion wurde wiederum mittels konfokaler Mikroskopie aus 140 Neuronen der jeweiligen Zellkulturen in randomisierter und verblindeter Weise quantifiziert. Die mittlere Pixel-Intensität war in den septalen Neuronen ($7,85 \pm 0,31$) und hippokampalen Neuronen ($8,61 \pm 0,44$) signifikant niedriger im Vergleich zu den kortikalen Neuronen ($10,86 \pm 0,39$; $p < 0,05$, one-way ANOVA on ranks mit nachfolgendem Tuckey's post hoc test).

Auch hier wurde als weiteres Kriterium zur Differenzierung der Fluoreszenzintensität der Neurone aus den drei Hirnregionen der Median der Pixel-Intensität aller gezählten Zellen (8,3) als Grenze zwischen Zellen „niedriger“ und „hoher“ Intensität gewählt.

In kortikalen Neuronen überwiegen die Zellen hoher Intensität (91 von 140 Zellen). Eine gegensätzliche Verteilung fand sich in septalen und hippokampalen Nervenzellen (Abb. 26 C).

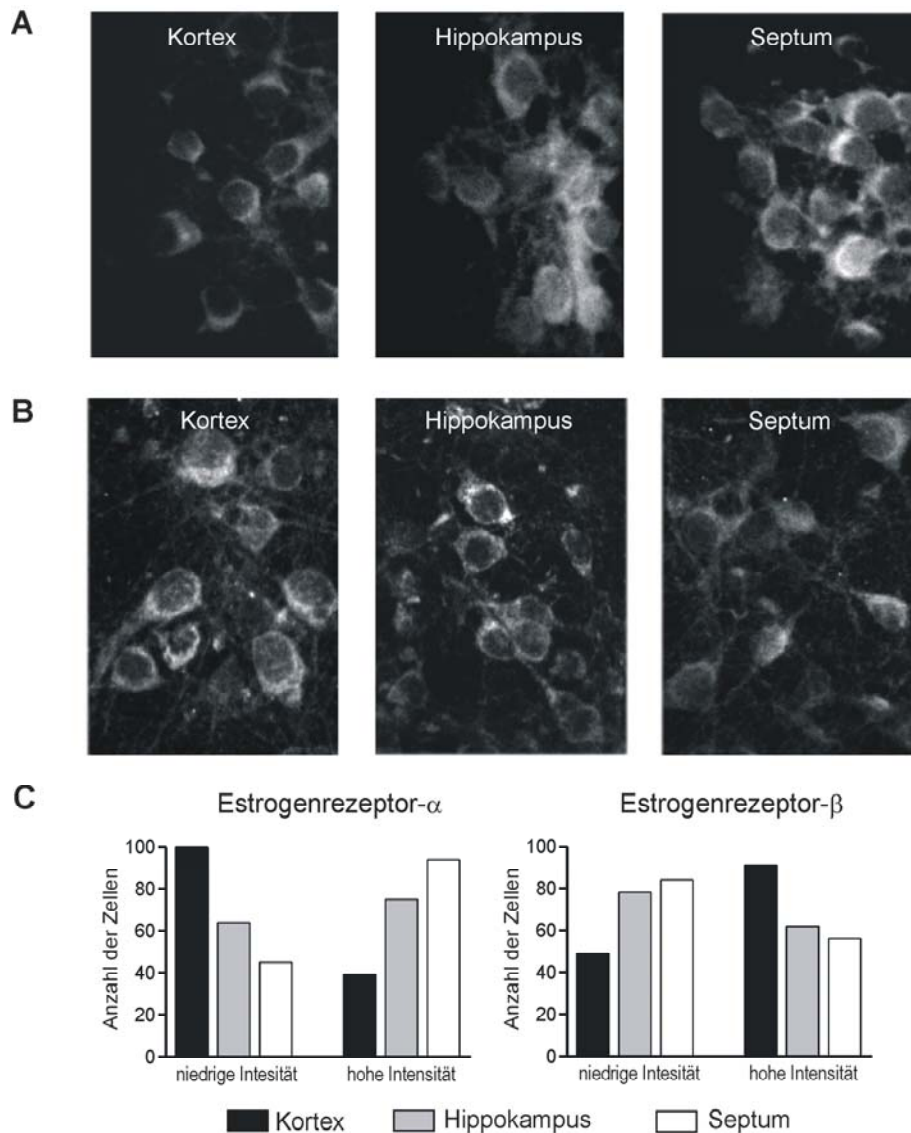


Abb. 26 A – C: Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von Estrogenrezeptor- α (A) und Estrogenrezeptor- β (B) in kortikalen, hippokampalen und septalen Neuronen. Zellkulturen aus den drei Regionen wurden 12 DIV kultiviert und dann mit 4 % Formaldehyd für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Immunzytochemie wurde, wie in den Materialien (Kap. 3.7.2.) beschrieben, durchgeführt. Die Kulturen wurden dann auf Objektträgern mit ImmunFluor Mounting Medium montiert und in der konfokalen Mikroskopie bei einer 630x-Vergrößerung digitalisiert. C: Verteilung von Estrogenrezeptor- α und Estrogenrezeptor- β -immunoreaktiven Neuronen anhand der Intensität der Fluoreszenz in kortikalen, hippokampalen und septalen Neuronen. Die quantitative Analyse wird in Kapitel 3.7.4. ausführlich beschrieben und erfolgte anhand der ermittelten mittleren Pixelintensitäten aus 139 bzw. 140 Neuronen je Region und Rezeptor. Diese Neuronen wurden in randomisierter und verblindeter Weise durch eine zweite Person ausgewählt. Die mediane Pixelintensität aller gezählten Neurone wurde als Grenze für die Zuordnung der Neurone zu Zellen mit niedriger oder hoher Intensität gewählt (8,9 für Estrogenrezeptor- α und 8,3 für Estrogenrezeptor- β).

4.8 Beteiligung der Phospho-Inositol-3-Kinase (PI-3-Kinase)-Kaskade an der zellschützenden Wirkung von 17 β -Estradiol

Um einen weiteren Hinweis für die Beteiligung von Estrogenrezeptor- α an der Neuroprotektivität von 17 β -Estradiol im AF64A-Modell der Zellschädigung zu erhalten, haben wir den Einfluss von LY294002 getestet. Diese Substanz ist ein Hemmer der PI-3-Kinase. Die Aktivierung dieser Kinase ist ein wichtiger Schritt im IGF-1-Rezeptorweg. Es konnte kürzlich gezeigt werden, das 17 β -Estradiol eine Aktivierung dieses Rezeptorweges nur über die Stimulation von Estrogenrezeptor- α , nicht aber über Estrogenrezeptor- β bewirken konnte (Kahlert et al., 2000). Bei Gabe von 5 μ M LY294002 zusammen mit 17 β -Estradiol konnte der protektive Effekt komplett aufgehoben werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verlust der neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Estradiol auf den Zelltod durch 40 μ M AF64A in hippokampalen und septalen Zellen nach Vorbehandlung mit LY 294002 (LDH-Anstieg in Δ Units / ml Medium, 48 h post). Die basale LDH-Ausschüttung in den korrespondierenden Kontrollkulturen war $43,3 \pm 4,9$ für die hippokampalen Zellen und $41,7 \pm 3,2$ Units/ml medium für die Zellkulturen aus dem Septum. n = 4 – 9. ^a p < 0,05 und ^b p < 0,001 versus AF64A + Vehikel; ^c p < 0,05 und ^d p < 0,001 versus AF64A + Estradiol.

	Zellkultur	AF64A + Vehikel	AF64A + LY294002	AF64A + Estradiol 0,1 μ M	AF64A + Estradiol + LY 294002
LY 294002 5 μ M	Hippokampus	$65,5 \pm 4,8$	$61,3 \pm 2,5$	$31,8 \pm 3,0$ ^b	$57,1 \pm 5,1$ ^d
	Septum	$49,4 \pm 5,5$	$49,2 \pm 4,3$	$24,9 \pm 3,4$ ^a	$46,5 \pm 6,1$ ^c

4.9 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die Arbeits-hypothesen bzw. Fragestellungen

Die in der Herleitung der Aufgabenstellung angeführten Fragestellungen können wie folgt zusammenfassend beantwortet werden:

ad 1) Melatonin war bei apoptotisch-degenerativem Zelluntergang durch AF64A oder Staurosporin nicht neuroprotektiv wirksam. Es liessen sich in Bezug auf die apoptotische Komponente der OGD keine protektiven Effekte durch Melatonin nachweisen. Hingegen konnte eine neuroprotektive Wirkung gegen exzitotoxisch-nekrotischen Schaden durch Melatonin nachgewiesen werden.

17 β -Estradiol wirkte im AF64A-Modell für die Auslösung neuronaler Apoptose protektiv, wenn eine Vorbehandlung von 20 h erfolgte und hippocampale oder septale Zellen verwendet wurden. An kortikalen Neuronen liess sich dieser Effekt nicht nachweisen, so dass hier ein grundlegender Unterschied zwischen den drei untersuchten Regionen auftrat. Eine Kurzzeitbehandlung von 1 h versagte ebenfalls. Dagegen konnte bei exzitotoxisch-nekrotischem Schaden durch Glutamat oder der OGD nach Kurzzeitbehandlung ein Schutz der Neurone gezeigt werden.

ad 2) Melatonin ist als potenter Radikalfänger in den verwendeten Modellen nicht in der Lage gewesen antiapoptotische Wirkung zu entfalten. Es zeigte sich zwar, dass die Lipidperoxidation (gemessen durch die Entstehung von Malondialdehyd), die nach AF64A oder Staurosporin nachweisbar war, durch Melatonin sehr effektiv verhindert werden konnte. Dies hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf den Zelltod. Auch weitere getestete Radikalfänger hatten keinerlei Auswirkung auf den Untergang der Neurone.

ad 3) Die antiapoptotische Wirkung durch die 20-stündige Vorbehandlung mit 17 β -Estradiol liess sich durch Proteinsynthesehemmung mit Cycloheximid und durch die Rezeptorantagonisten Tamoxifen und ICI182,780 blockieren. Auch die induzierten höheren Expressionslevel der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L nach Behandlung mit 17 β -Estradiol traten bei gleichzeitiger Gabe der Antagonisten nicht auf. Bei exzitotoxisch-induziertem Zellschaden konnte durch Tamoxifen die Schutzwirkung des 17 β -Estradiol bei Kurzzeitbehandlung

nicht aufgehoben werden, so dass hier ein Rezeptor-unabhängiger Mechanismus wahrscheinlich ist.

ad 4) 17 β -Estradiol wirkte nur in septalen und hippokampalen Kulturen bei apoptotischer Degeneration neuroprotektiv. Dieser Rezeptor-abhängige Effekt (siehe 3) könnte auf mögliche Unterschiede in der Expression der beiden Estrogenrezeptoren beruhen, die wir immunzytochemisch nachgewiesen haben. Es zeigte sich eine im Vergleich zum Kortex höhere Expression von Estrogenrezeptor- α im Hippokampus und Septum, während im Kortex die Intensität des Estrogenrezeptor- β dominierte. Der neuroprotektive Effekt im Septum und Hippokampus ist nach unserer Hypothese über den Estrogenrezeptor- α vermittelt. Untermauert wird diese These durch die unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden und Genexpressionsmuster nach Stimulation der beiden Rezeptoren. Der Estrogenrezeptor- α ist mit der PI-3-Kinase verbunden und führt zur Aktivierung des IGF-1-Rezeptorweges. LY294002 hemmt diese Kinase und konnte den protektiven Effekt aufheben. Der antagonistische Effekt von LY294002 kann daher als weiterer Hinweis für die Beteiligung des Estrogenrezeptor- α gewertet werden.

5 Diskussion

5.1 Melatonin

Die vorliegende Studie ermöglichte neue Einsichten in das neuroprotektive Potential von Melatonin. Die Ergebnisse bestätigen die neuroprotektive Potenz von Melatonin in Modellen der neuronalen Nekrose, die mit einer Akkumulation von freien Radikalen verbunden sind. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Cazevielle et al., 1997) wurde der Zelltod kortikaler Neurone durch OGD zumindestens teilweise durch Melatonin verhindert. Im Gegensatz dazu fand sich kein Hinweis für schützende Eigenschaften von Melatonin im Falle der Apoptose. Das konnte in drei unterschiedlichen Modellen der neuronalen Apoptose gezeigt werden. Alle drei Modelle waren von der Aktivierung von Caspasen abhängig (Gottron et al., 1997; siehe eigene Ergebnisse), unterschieden sich aber im Mechanismus und im Zeitverlauf, der zur

Apoptose führte. Bei der neuronalen Apoptose, ausgelöst durch Gabe von AF64A oder Staurosporin, war Melatonin nicht neuroprotektiv wirksam. Des Weiteren fehlte der Schutz durch Melatonin auch in Bezug auf die apoptotische Komponente der OGD. Der neuronale Zelltod durch Ischämie wurde traditionell der Nekrose zugeordnet. Immer mehr Hinweise deuten aber auch auf eine Beteiligung der Apoptose bei der Schädigung des Gehirns durch Ischämie und *in vitro* lässt sich dieser Apoptoseanteil mit Glutamatantagonisten demaskieren (Gotttron et al., 1997 und Copin et al., 1998). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Melatonin nicht mehr neuroprotektiv gegen die OGD war, wenn der exzitotoxische, durch NMDA-Rezeptoren vermittelte hypoxische Schaden durch den Glutamatantagonisten MK-801 verhindert wurde und folglich der apoptotische Zelltod dominierte. Der begrenzte Effekt von Melatonin in der Hypoxie ohne Blockade der NMDA-Rezeptoren ist vielleicht dadurch zu erklären, dass sich die Wirksamkeit von Melatonin nur auf die nekrotischen Zelltodanteile bei der OGD beschränkt. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass Trolox, ein antioxidatives Analog zu Vitamin E, die Nekrose durch Sauerstoffentzug in kortikalen Neuronen verhindern konnte, aber die Apoptose demaskierte (Copin et al., 1998). Die limitierte Wirksamkeit von Melatonin geht auch aus früheren Untersuchungen hervor. Melatonin schützte bei exzitotoxischer Schädigung durch NMDA Kleinhirnneuronen nicht vor dem Schaden (Guisti et al., 1995) und erwies sich bei Schädigung durch 3-Hydroxyglutarat, das über den NMDA-Rezeptor exzitotoxisch wirkt, in kortikalen Neuronenkulturen aus Hühnerembryonen als weniger wirksam als Vitamin E bzw. α -Tocopherol (Kölker et al., 2001). Das erklärt auch die bessere Wirksamkeit von MK801 gegenüber Melatonin bei der Reduktion der LDH-Freisetzung 24 h nach 120-minütiger OGD ($40,6 \pm 4,0$ % versus $78,2 \pm 7,9$ % Reduktion der LDH-Aktivität; siehe auch Tabelle 7).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen auf die unterschiedliche neuroprotektive Effektivität von Melatonin, abhängig von der Art des Zelltodes, hin. Erst durch die Anwendung einer Vielzahl von Modellen war es möglich, ein besseres Verständnis über das neuroprotektive Potential dieser endogenen Substanz zu bekommen. Aus diesem Grunde wählten wir drei verschiedene Modelle für eine vorwiegend apoptotische Zelldegeneration aus, die sich im Zeitverlauf der Apoptoseinduktion deutlich unterscheiden. Die Besonderheit im AF64A-Modell der Apoptoseauslösung ist die langsam innerhalb von 72 h fortschreitende Zelldegeneration. Innerhalb der ersten 24 h sind keine morphologischen Veränderungen oder ein LDH-Anstieg im

Medium zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist die neuronale Apoptose bei Staurosporin nach 24 h voll ausgeprägt. Auch nach OGD ist der Anteil der apoptotischen Zellschädigung nach 24 h schon voll entwickelt (siehe Abb. 17).

Verschiedene Mechanismen der neuroprotektiven Strategien von Melatonin wurden diskutiert (siehe Einleitung). Keiner dieser Mechanismen war in der Lage, mit dem Ablauf der langsamen Caspase-abhängigen Apoptose in Wechselwirkung zu treten und den neuronalen Zelltod in den drei angewandten Apoptosemodellen zu verhindern. Das bezieht sich auch auf die antioxidativen Eigenschaften von Melatonin. Obwohl der Anstieg von Malondialdehyd in den ersten 24 h nach Gabe von AF64A durch Melatonin blockiert wurde, führte diese Blockade nicht zu einer Reduzierung des apoptotischen Zellverlusts. Darum scheint der oxidative Stress im AF64A-Modell, der *in vitro* in der vorliegenden Studie durch Anstieg der Malondialdehyd-Konzentration gezeigt wurde (siehe Abb. 14) und auch *in vivo* nach intrazerebroventrikulärer Injektion von AF64A beobachtet wurde (Gulyaeva et al., 1996), den Ablauf des programmierten Zelltods weder zu initiieren noch in diesem spezifischen Modell zu unterstützen. Das konnte auch für die Apoptose durch Staurosporin gezeigt werden und bezieht sich möglicherweise auch auf die apoptotische Komponente bei der OGD. Die geringe Beteiligung freier Radikale in diesen Modellen wird auch dadurch bestätigt, dass die Antioxidantien PBN und DMTU im AF64A- und Staurosporinmodell zwar den Anstieg von Malondialdehyd antagonisierten, aber keineswegs den neuronalen Zelltod verhinderten. Bei exzitotoxischer Schädigung konnte Melatonin sowohl die Bildung von Lipidperoxydationsprodukten als auch den neuronalen Schaden nach Injektion von Quinolinsäure verhindern (Behan et al., 1999).

Frühere Erfahrungen zeigen, dass Melatonin die neuronale Apoptose im Falle der Zellschädigung durch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), β -Amyloid und Kainat *in vitro* und *in vivo* abschwächen konnte. Für die neuroprotektive Wirkung von Melatonin in diesen Modellen können folgende Mechanismen verantwortlich sein: Beim 6-OHDA-Modell ist die Art des Zelltodes dosisabhängig. 6-OHDA löst in niedrigen Dosen Apoptose innerhalb von 18 – 24 h aus, wie dies in kultivierten dopaminergen Neuronen, zerebellären Körnerzellen und PC12-Zellen gezeigt werden konnte (Lotharius et al., 1999; Dodel et al., 1999; Mayo et al., 1999). In höheren Dosen jedoch sterben die Zellen bei Schädigung durch 6-OHDA aber innerhalb von 6 h durch Nekrose (Dodel et al., 1999). Der Mechanismus der Zellschädigung durch 6-OHDA schließt in beiden Fällen die Bildung von Hydrogenperoxiden, Superoxiden und frei-

en Radikalen ein (Cohen und Heikkila, 1974), die Melatonin detoxifizieren kann. Die zelltoxischen Eigenschaften von β -Amyloid werden mit freien Sauerstoffradikalen und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Exzitotoxizität, die Melatonin detoxifizieren kann, in Zusammenhang gebracht. Für die durch β -Amyloid induzierte Zellschädigung wurden je nach Zelltyp sowohl Nekrose als auch Apoptose beschrieben (Behl et al., 1994; Copani et al., 1995; Gschwind und Huber, 1995). Die zellschützenden Eigenschaften von Melatonin gegen β -Amyloid können auch durch die Fähigkeit von Melatonin *in vitro* erklärt werden, die Sekundärstruktur von β -Amyloid zu verändern und die Bildung der für die Toxizität verantwortlichen Amyloidfibrillen zu verhindern (Pappolla et al., 1998). Für die Beurteilung der Wirksamkeit von Melatonin im Kainat-Modell sind folgende Punkte zu beachten: Es liegen *in vivo* Beweise dafür vor, dass Melatonin gegen DNS-Schädigung schützt, die 48 und 72 h nach intraperitonealer Gabe von Kainat im Hippokampus von Ratten beobachtet werden konnte (Uz et al., 1996). Der verzögerte Beginn der apoptotischen Zellschädigung nach Kainatgabe schließt eine direkte neurotoxische Wirkung von Kainat aus und somit auch eine direkte antiapoptotische Wirkung von Melatonin. Viel wahrscheinlicher läßt sich der schützende Effekt des Melatonins gegen die verzögerte Apoptose als Reaktion auf die Kainatgabe durch die Verminderung der epileptischen Aktivität bei Melatoninbehandlung erklären (Giusti et al., 1996; Tan et al., 1998 und Lapin et al., 1998). Der apoptotische Zelluntergang in hippokampalen Neuronen nach Kainatgabe konnte auch verhindert werden, wenn die epileptische Aktivität durch Diazepam blockiert wurde (Pollard et al., 1994). Es wird angenommen, dass der neuroprotektive Effekt von Melatonin gegen zerebrale Schädigung durch Kainat mit der Fähigkeit Sauerstoffradikale wegzufangen und der antiepileptischen Eigenschaften durch Regulation des GABA-Rezeptors zusammenhängt (Tan et al., 1998). Außerdem reduzierte Melatonin die Apoptoserate nach intrastriateller Injektion von Kainat nur im angrenzenden Kortex, nicht jedoch im Striatum, ein weiterer Befund, der eine direkte antiapoptotische Wirkung von Melatonin ausschließt (Chen und Chuang, 1999). Die Hochregulation des Glutathionsystems als antioxidatives Verteidigungssystem durch Melatonin wurde als weiterer Mechanismus für die Reduktion des exzitotoxischen neuronalen Zelltodes und die Verhinderung der Ausbreitung des Schadens auf angrenzende Hirnregionen diskutiert (Floreani et al., 1997; Chen und Chuang, 1999).

In der vorliegenden Studie konnten Hinweise gewonnen werden, dass Melatonin den neuronalen Zelltod in Kulturen sowohl unter basalen Bedingungen als auch

nach neuronaler Schädigung verstärken kann. Bei Behandlung von nativen primären neuronalen Zellkulturen mit Melatonin konnte ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung innerhalb von 72 h demonstriert werden. Dieser schädigende Effekt von Melatonin wurde bisher noch nicht dokumentiert. In den relevanten Studien wurden entweder keine LDH-Werte für Kontrollkulturen angegeben oder der Beobachtungszeitraum war 24 h oder kürzer. Zu diesem Zeitpunkt war eine Veränderung der Lebensfähigkeit der Zellen in unseren Zellkulturen noch nicht erkennbar. Dieser zytotoxische Effekt war bei den anderen von uns untersuchten Antioxidantien jedoch nicht nachweisbar. Bei der Behandlung mit PBN oder DMTU trat auch nach 72 h keine Veränderung der LDH-Freisetzung auf. Die beobachtete Zytotoxizität von Melatonin könnte auf das Vorhandensein pro-oxidativer Aktivitäten des Antioxidants Melatonin hindeuten. Dieses Phänomen wurde für Melatonin und andere antioxidative Substanzen wie Estrogene oder Vitamin C beschrieben (Ilan et al., 1991; Nathan und Chaudhuri, 1998; Medina-Navarro et al., 1999; Paolini et al., 1999). Der Anstieg von Malondialdehyd durch Melatonin in nativen Kulturen unterstreicht das pro-oxidative Potential von Melatonin. Basierend auf Untersuchungen von Reiter wird angenommen, dass die Wirkung von Melatonin auf einer Entgiftung von Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) über Abgabe von Elektronen beruht (Reiter, 1998). Während dieser Reaktion wird Melatonin selbst zum Radikal, dem Indolykation-Radikal. Es wurde gezeigt, dass radikale Indolkationen mit Sauerstoff reagieren, so dass bei der Entstehung von Indoxylen peroxyradikale Intermediärprodukte entstehen. Die Bildung des radikalen Melatoninkations wurde zum Beispiel für die Verstärkung des Vitamin E-Verbrauchs nach oxidativem Stress in roten Blutkörperchen verantwortlich gemacht (Barsacchi et al., 1998). Medina-Navarro und Mitarbeiter (1999) schlugen außerdem die Bildung von oxidativen Sekundärprodukten als einen möglichen Mechanismus der pro-oxidativen Eigenschaften von Melatonin vor. Eine pro-oxidative Aktivität würde auch unsere Befunde erklären, dass Melatonin die LDH-Freisetzung nach AF64A- oder Staurosporin-Gabe noch verstärkte und der protektive Effekt gegen OGD in den höheren Melatonin-Dosen schwächer war. Eine Potenzierung neuronaler Schädigung durch Melatonin wurde auch bei der Neurotoxizität von Metamphetamin in Ratten beobachtet (Gibb et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass die therapeutische Anwendung von Melatonin in höheren Dosen mit möglichen Risiken behaftet ist. Der Bericht über einen prokonvulsiven Effekt von Melatonin bei neurologisch erkrankten Kindern unterstreicht die klinische Relevanz dieses Befundes (Sheldon, 1999).

Zusammenfassend stützen die Daten die These, dass die Neuroprotektivität von Melatonin von der Ursache des neuronalen Zelltods abhängt. An drei unterschiedlichen Modellen der neuronalen Caspase-abhängigen Apoptose konnte der Ablauf des neuronalen apoptischen Zelluntergangs durch Melatonin nicht gehemmt werden, ganz im Gegensatz zur Wirksamkeit bei exzitotoxisch-nekrotischem Zelltod. Wenn die Entstehung von freien Radikalen oder ein Exzess von Exzitotoxinen die Hauptursachen für die Auslösung des Zelltodprogrammes sind, könnte Melatonin schützend wirksam sein. Zusätzlich zu diesen vorteilhaften Eigenschaften von Melatonin konnten jedoch auch Hinweise für die Verstärkung des neuronalen Schadens durch Melatonin gewonnen werden. Melatonin könnte als endogener, protektiver Faktor nützlich für die pharmakologische Behandlung der Neurodegeneration durch Glutamatexzitotoxizität und / oder oxidativen Stress wie Ischämie des Gehirns oder Epilepsie sein. Eine potentielle therapeutische Anwendung von Melatonin in neurodegenerativen Prozessen, die hauptsächlich mit dem apoptotischen Typ des neuronalen Zelltods assoziiert sind, ist fraglich.

5.2 17 β -Estradiol

Im zweiten Teil der Studie konnte gezeigt werden, dass *in vitro* an der neuroprotektiven Wirksamkeit von 17 β -Estradiol unterschiedliche Mechanismen beteiligt sind, je nachdem ob das verwendete Schadensmodell hauptsächlich den apoptotischen oder den exzitotoxisch-nekrotischen Typ des neuronalen Zelltods induziert. Außerdem konnten hirregionsspezifische Unterschiede in der neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Estradiol beobachtet werden. Wenn Apoptose durch AF64A ausgelöst wurde, konnte eine Wirksamkeit durch 17 β -Estradiol nur durch die sogenannte Langzeitbehandlung (20 h-Gabe) im Dosisbereich von 0,1 μ M in septalen und hippokampalen, jedoch nicht in kortikalen Kulturen erzielt werden. Der neuroprotektive Effekt konnte durch den Estrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 und Tamoxifen oder durch Hemmung der Proteinsynthese aufgehoben werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Verhinderung des apoptotischen, neuronalen Zelltods durch 17 β -Estradiol in diesem Modell möglicherweise über eine Regulation auf Transkriptionsebene über Aktivierung von Estrogenrezeptoren vermittelt wird. Ähnliche Hinweise wurden bei der Neuroprotektivität durch 17 β -Estradiol gegen β -Amyloid-Toxizität in

hippokampalen Neuronenkulturen gefunden (Pike, 1999). Kurzzeitige Estrogenrezeptor-unabhängige Mechanismen spielten keine Rolle im AF64A-Modell der apoptotischen, neuronalen Schädigung.

Im Falle der apoptotischen Zellschädigung durch den breitwirksamen Proteinkinaseinhibitor Staurosporin konnten septale, hippocampale und kortikale Neuronenkulturen weder durch die Kurz- noch durch die Langzeitbehandlung mit 17 β -Estradiol vor dem apoptotischen Zelluntergang bewahrt werden. Das Versagen von 17 β -Estradiol, im Staurosporin-Modell der apoptotischen Neurodegeneration entgegenzuwirken, erklärt sich zumindest teilweise durch die folgenden Befunde. Es konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Staurosporin den durch die Langzeitbehandlung mit 17 β -Estradiol induzierten Anstieg der Expression von Bcl-2 verhinderte. Des Weiteren könnte die Hemmung der Proteinkinasen durch Staurosporin zur Ineffektivität von 17 β -Estradiol beitragen. Die Rolle der durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase initiierten Signalkaskade in der Neuroprotektivität von Estrogenen wurde bei Glutamat-induzierter Exzitotoxizität in primären, kortikalen Neuronenkulturen diskutiert (Singer et al., 1999).

Wurde die neuronale Schädigung durch Exzitotoxizität oder OGD ausgelöst, war nur die Kurzzeitbehandlung mit höheren Dosen von 17 β -Estradiol (0,5 – 1,0 μ M) wirksam. Dieser Effekt konnte durch Estrogenrezeptorblockade nicht verhindert werden. Diese Befunde stimmen mit bereits bekannten Ergebnissen aus kortikalen, hippocampalen und mesencephalen dopaminergen Neuronenkulturen überein (Goodman et al., 1996; Behl et al., 1997; Regan und Guo, 1997; Sawada et al., 1998). Die Unabhängigkeit der Neuroprotektivität von Estrogenen von rezeptor-vermittelten Wegen oder Proteinsynthese bei Exzitotoxizität oder OGD konnten von verschiedenen Gruppen gezeigt werden (Sawada et al., 1998; Moosmann und Behl, 1999; Zaulyanov et al., 1999). Diese Ergebnisse und die unmittelbare Effektivität von höheren Dosen von 17 β -Estradiol weisen daraufhin, dass Mechanismen unabhängig von transkriptioneller Regulation involviert sind. Das könnten zum Beispiel antioxidative Fähigkeiten von Estrogenen, direkte Hemmung von NMDA-Rezeptoren (Weaver et al., 1997), die schnelle Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Beyer und Raab, 1998), die Stimulation der Guanylatcyclaseaktivität (Chen et al., 1998), Blockade des Calciumeinstroms über Calciumkanäle vom L-Typ (Mermelstein et al., 1996) und Stabilisierung der Mitochondrienfunktion (Mattson et al., 1997) sein. Zusätzlich wird die Beteiligung möglicher Membranbindungsstellen auf Neuronen für

verschiedene Steroide, Estrogene eingeschlossen, diskutiert (Übersichtsarbeit von Behl und Holsboer, 1999). Unsere Ergebnisse der Ineffektivität von 17 β -Estradiol (0,1 – 5,0 μ M) nach Langzeitbehandlung im Glutamat- oder OGD-Modell stehen jedoch im Gegensatz zur signifikanten Protektion gegen Exzitotoxizität in hippokampalen Neuronenkulturen oder hippokampalen Slicekulturen, denen niedrige Dosen von 17 β -Estradiol (1 – 50 nM) 24 h vor den Exzitotoxinen zugegeben wurden (Singer et al., 1996; Bi et al., 2000). Dabei ist aber zu beachten, dass eine vergleichbare Wirkung in den hippokampalen Slicekulturen erzielt wurde, unabhängig davon, ob das Steroid 24 h oder zehn Minuten vor den Exzitotoxinen zugegeben wurde (Bi et al., 2000). Die Diskrepanzen zwischen diesen Studien und der vorliegenden Arbeit könnten mit der kürzeren Expositionsperiode (Singer et al., 1996) oder der niedrigeren Dosis von Exzitotoxinen in völlig verschiedenen Kultursystemen (Bi et al., 2000) in Verbindung gebracht werden.

Die Ineffektivität der Kurzzeitbehandlung mit 17 β -Estradiol im AF64A- und Staurosporinmodell der apoptotischen Neurodegeneration stimmt sehr gut mit den Ergebnissen überein, die zeigen, dass in den gleichen Modellen mit verschiedenen Antioxidantien wie Melatonin, PBN oder DMTU keine schützende Wirkung erzielt werden konnte. In beiden Modellen verhinderten die antioxidativen Substanzen den initialen Anstieg von Malondialdehyd, das die Akkumulation von freien Radikalen anzeigt, konnten aber nicht die Induktion der Apoptose verhindern (siehe Tabelle 4 – 6 und Abb. 14 – 16 oder Seite 1818 – 1819 bei Harms et al., 2000).

Die hirnregionsspezifischen Unterschiede in der neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Estradiol im Falle apoptotischer Schädigung sind von besonderem Interesse. Wir konnten beobachten, dass die Langzeitbehandlung mit 17 β -Estradiol nur in hippokampalen und septalen Neuronenkulturen schützend gegen AF64A-induzierte Apoptose wirkte, den Zelluntergang in kortikalen Kulturen jedoch nicht abschwächte. Im Gegensatz dazu waren kortikale Neurone, die mit 17 β -Estradiol 1 h vorbehandelt wurden, weniger vulnerabel gegen Glutamatbehandlung oder OGD, ein Effekt, der durch Tamoxifen nicht antagonisiert wurde. Es werden also rezeptorunabhängige Effekte von 17 β -Estradiol in kortikalen Kulturen wirksam, wohingegen Modulationen der Genaktivierung entweder nicht existieren oder eine Neuroprotektivität gegen AF64A in kortikalen Kulturen nicht vermitteln. Eine mögliche Erklärung für die regionsspezifische Protektivität ist die unterschiedliche Verteilung und Regulation von

Estrogenrezeptor- α und Estrogenrezeptor- β im Gehirn (Shughrue et al., 1997; Laflamme et al., 1998). Es ist auch immer noch offen, welcher Rezeptorsubtyp die neuroprotektive Wirkung von Estrogenen vermittelt. Laut Sawada und Mitarbeitern (2000) wird die neuroprotektive Wirkung von Estradiol in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra durch die Supprimierung proapoptotischer Gentranskription über die AP-1-Seite über Aktivierung des β -Estrogenrezeptors vermittelt. Andererseits wurde der Hirnschaden in experimentellen Schlaganfallmodellen in α -Estrogenrezeptor-defizienten weiblichen Mäusen nicht verstärkt, ein Befund der beinhalten könnte, dass Estrogene den Hirnschaden unabhängig von einer Aktivierung von α -Estrogenrezeptoren entfalten können (Sampei et al., 2000). Auf der anderen Seite unterstützen viele Studien die Beteiligung vom α -Estrogenrezeptor. Hinweise für einen Zusammenhang von Estrogenrezeptor- α , erhöhter Bcl-x_L-Expression und Neuroprotektion zeigten sich in hippokampalen Kulturen (Pike, 1999). Außerdem schützte Estradiol in α -Estrogenrezeptor-Knockout-Mäusen nicht gegen ischämischen Schaden, während die neuroprotektive Wirkung in β -Estrogenrezeptor knock-out Mäusen voll erhalten blieb (Dubal et al., 2001). Diese Befunde weisen eindeutig auf eine Abhängigkeit der Neuroprotektion durch Estradiol vom α -Estrogenrezeptor hin, die wir in unserer Studie bestätigen konnten. Zwei Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für die dominante Rolle des α -Estrogenrezeptors: 1. Die niedrigste Intensität der Immunfluoreszenz für α -Estrogenrezeptor und die höchste Intensität für den β -Estrogenrezeptor fanden sich in kortikalen Kulturen im Vergleich zu hippokampalen und septalen Kulturen. Das stimmt mit *in vivo*-Studien in der adulten Ratte überein (Shughrue et al., 1997 und Laflamme et al., 1998) und bestärkt neuere Ergebnisse, die besagen, dass der α -Estrogenrezeptor immunzytochemisch in kultivierten Neuronen des embryonalen Kortex der Ratte (E14) kaum detektierbar war (Zhang et al., 2000). 2. Die Neuroprotektion durch 17 β -Estradiol konnte bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Phosphoinositol-3-Kinase-(PI3-Kinase)-Hemmer LY294002 nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Antagonisierung des 17 β -Estradiols durch LY294002 wurde auch durch Honda gezeigt (Honda et al., 2000). Dieser Befund weist einerseits auf die Rolle der PI3-Kinase in der Estradiol-vermittelten Neuroprotektion und eine mögliche Beteiligung des IGF-1-Rezeptorweges hin. Kahlert et al. (2000) konnten kürzlich zeigen, dass diese Kaska-

de über den α -Estrogenrezeptor nicht aber über den β -Rezeptor aktiviert wird. In Abbildung 27 ist diese Kaskade schematisch dargestellt.

Ungeachtet einer vergleichbaren Affinität der beiden Estrogenrezeptor-subtypen für 17 β -Estradiol (Kuiper et al., 1997), spiegeln die beiden Formen der Rezeptoren unterschiedliche Affinitäten für natürlicherweise vorkommende Hormonantwort-Elemente wieder, so dass unterschiedliche Genexpressionsmuster durch die Aktivierung der beiden Subtypen ausgelöst werden (Hyder et al., 1999). Das bezieht sich nicht nur auf die Aktivierung des IGF-1-Rezeptorweges, sondern auch auf die Aktivierung der Transkription an den AP-1-Bindungsstellen (Paech et al., 1997; Kahlert et al., 2000).

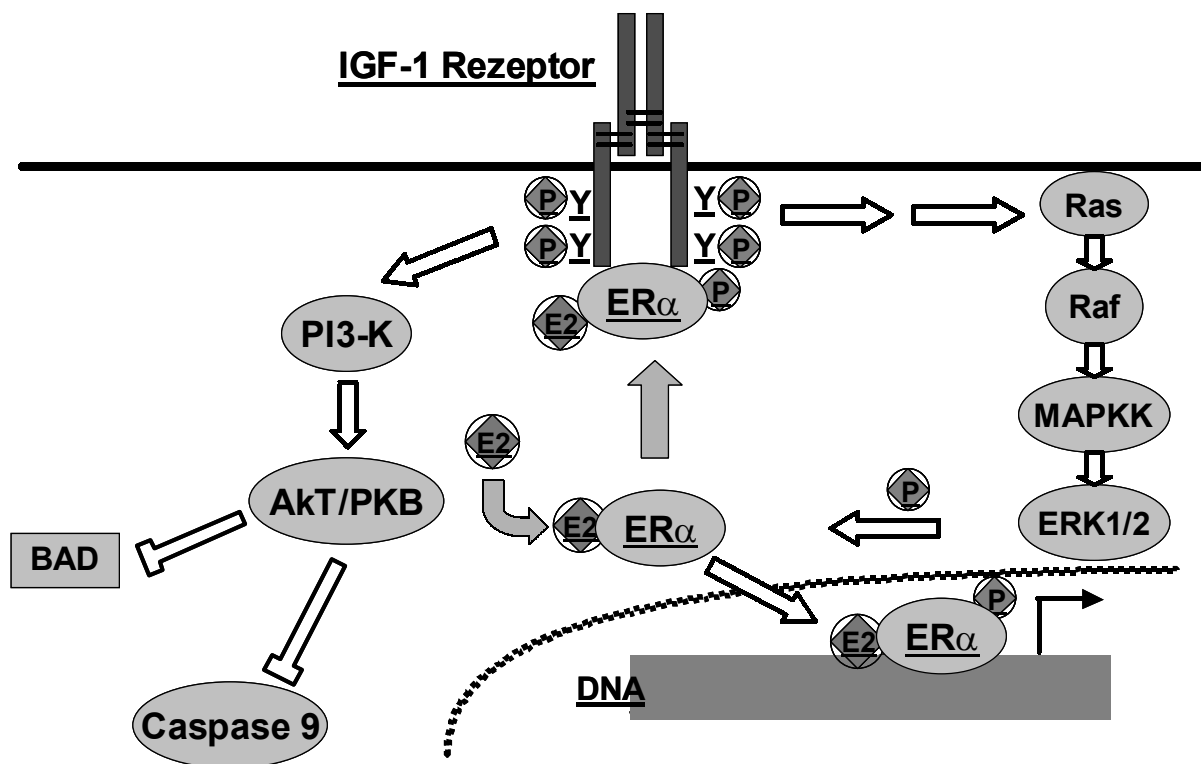


Abb. 27: Interaktion zwischen Estrogenrezeptor- α und dem IGF-1-Rezeptorweg (modifiziert nach einem Vorschlag von Kahlert et al., 2000).

Einer der Mechanismen, die an der neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Estradiol beteiligt sein könnten, ist die Fähigkeit von 17 β -Estradiol, die Expression von Proteinen der Bcl-Familie zu modulieren. Dieser Effekt wurde erstmals in peripheren, nicht-neuronalen Geweben gezeigt (humane Brustkrebszellen, Endometrium während der proliferativen Phase des Menstruationszyklus; siehe Bhargava et al., 1994; Otsuki et al., 1994; Teixeira et al., 1995). Im Gehirn wurde eine Hochregulation

von Bcl-2 durch Estradiol in hypothalamischen Neuronen weiblicher Ratten *in vivo* gefunden (Garcia-Segura et al., 1998). Estradiol verhinderte die durch ischämische Hirnschädigung ausgelöste Herabregulation der Bcl-2-Expression in zerebralen Kortex von ovariectomierten weiblichen Ratten (Dubal et al., 1999). Außerdem führte 17 β -Estradiol zu einer signifikanten Steigerung der Bcl-x_L-Spiegel in hippokampalen Neuronenkulturen (Pike, 1999). In der vorliegenden Studie fanden wir einen Anstieg der Bcl-2- und Bcl-x_L-Spiegel in kultivierten hippokampalen und septalen Neuronen bis zu 68 h nach 17 β -Estradiol-Behandlung (30 – 100 nM), wohingegen die gleiche Behandlung in kortikalen Kulturen keine Veränderung der Bcl-2- und Bcl-x_L-Spiegel brachte. 17 β -Estradiol intensivierte auch den nach der Gabe von AF64A beobachteten Anstieg der Bcl-2-Expression in hippokampalen Kulturen.

Obwohl der Dosisbereich von 17 β -Estradiol in den vorliegenden Experimenten vergleichbar mit den meisten anderen Studien *in vitro* (Lee & McEwen, 2001) über dem physiologischen Bereich (Konzentration um 10^{-9}) liegt, könnten diese Daten in gewissem Maße hilfreich sein, klinische Befunde zu erklären. Die erste, kontrollierte, prospektive klinische Studie mit adäquater Dauer, die die Wirksamkeit von Estrogenen in der Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung untersuchte, ergab keine Hinweise auf eine therapeutische Bedeutung der Estrogene für die Behandlung dieser Erkrankung (Mulnard et al., 2000). Bei der Alzheimer'schen Erkrankung ist zu berücksichtigen, dass auch der zerebrale Kortex betroffen ist. Das Fehlen eines Effektes von 17 β -Estradiol in kortikalen Neuronen zum einen auf die Bcl-2- und Bcl-x_L-Expression und zum anderen der fehlende Schutz gegen die AF64A-induzierte Apoptose in kortikalen Neuronen könnten eine experimentelle Basis für das Verständnis bieten, warum die kürzlich veröffentlichte Studie keinen Einfluss der Estrogenbehandlung (0,625 – 1,25 mg / d) auf die Progression der Erkrankung bei Frauen mit milder bis moderater Alzheimer'scher Erkrankung zeigen konnte.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden in neuronalen Primärkulturen die neuroprotektiven Eigenschaften zweier endogener Substanzen, Melatonin und 17 β -Estradiol untersucht. Es wurden verschiedene Modelle der Zellschädigung eingesetzt, die zum einen einen vorwiegend exzitotoxisch / nekrotischen Schaden und zum anderen einen verzögerten, neuronalen Zelltod mit überwiegend apoptotischen Charakteristika auslösten. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass das neuroprotektive Potential sowohl von Melatonin als auch von 17 β -Estradiol von der Art der neuronalen Schädigung abhängig ist und je nach Zellschädigung auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen kann. Die Wirkung von Melatonin und 17 β -Estradiol wurde an drei Caspase-abhängigen, apoptotischen, aber Exzitotoxin-unabhängigen Neurodegenerationsmodellen untersucht und mit der bei vorwiegend nekrotischen Schadensmodellen verglichen.

Melatonin war in allen drei unterschiedlichen apoptotischen Modellen nicht in der Lage, den Untergang neuronaler Zellen aufzuhalten. In diesen Modellen wurde die Schädigung der Nervenzellen durch Melatonin sogar noch verstärkt, während Melatonin partiell gegen die durch OGD-induzierte Nekrose in kortikalen Neuronen schützen konnte. Der Einsatz des endogenen neuroprotektiven Faktors Melatonin als Therapeutikum ist möglicherweise nur bei neurodegenerativen Erkrankungen mit exzitotoxischer Schädigung durch Glutamat oder oxidativem Stress wie bei Epilepsie oder dem Schlaganfall durch Ischämie sinnvoll. Die fehlende bzw. potenzierenden Wirkung von Melatonin bei neuronaler Apoptose *in vitro*, stellt jedoch einen therapeutischen Erfolg bei der Behandlung der mit apoptotischer Schädigung einhergehenden Alzheimer'schen Erkrankung in Frage. Bei klinischer Anwendung ist auch der von uns erhobene Befund zu beachten, dass *in vitro* native neuronale Zellen durch Melatonin geschädigt werden.

17 β -Estradiol wirkte sowohl bei nekrotischer als auch bei apoptotischer Zellschädigung. Dabei zeigten sich wesentliche Unterschiede in den Mechanismen der Neuroprotektion und in der Ansprechbarkeit verschiedener Regionen des Gehirns. Die Langzeitvorbehandlung (20 h) mit 0,1 μ M 17 β -Estradiol war bei AF64A-induzierter apoptotischer Schädigung nur in hippokampalen und septalen, nicht jedoch in kortikalen Kulturen wirksam. Der neuroprotektive Effekt wurde durch den

Estrogenantagonisten ICI 182,780 und Tamoxifen, sowie durch den Phosphoinositol-3-Kinase-Hemmer LY294002 blockiert. Bei Glutamat oder OGD war die Langzeitvorbehandlung nicht effektiv, während bei der Kurzzeitbehandlung (1 h) von kortikalen Kulturen mit 0,5 – 1,0 μM 17 β -Estradiol eine durch Estrogenantagonisten nicht beeinflussbare Reduktion der nach Glutamat- oder OGD-Behandlung auftretenden Freisetzung der LDH-Aktivität sowie eine Verbesserung der morphologischen Veränderungen erzielt werden konnte. Kurzzeitbehandlung war bei apoptotischer Schädigung durch AF64A unwirksam. Gegen Staurosporin induzierten Schaden waren weder die Kurz- noch die Langzeitvorbehandlung mit 17 β -Estradiol neuroprotektiv. Die bevorzugte Expression von Estrogenrezeptor- α und die Induktion der Proteine der Bcl-Familie durch 17 β -Estradiol in hippokampalen und septalen, nicht jedoch in kortikalen Kulturen deuten daraufhin, dass die Prävention des apoptotischen, aber nicht des nekrotischen Zelluntergangs durch 17 β -Estradiol möglicherweise von der Induktion dieser Bcl-Proteine und der Dichte des α -Estrogenrezeptors abhängig ist. Da bei der Alzheimer'schen Erkrankung der Kortex betroffen ist, könnte der fehlende Effekt von 17 β -Estradiol in kortikalen Neuronen sowohl auf die neuronale Apoptose als auch auf die Proteinexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L möglicherweise auf experimenteller Basis erklären, warum eine langfristige Estrogentherapie bei Frauen mit milder bis moderater Alzheimer'scher Erkrankung den Progress der Erkrankung nicht aufhalten konnte (Mulnard et al. 2000).

Für die Zukunft ist die Entwicklung von synthetischen Estrogenderivaten, die eine möglichst selektive Wirkung im Zentralnervensystem entfalten, und nur am Estrogenrezeptor- α agonistisch wirken vielleicht eine aussichtsreiche Strategie zur effektiveren Wirkung von Estrogenen. Die Wirksamkeit derartiger Substanzen könnte in den von uns eingesetzten *in vitro*-Modellen überprüft werden.

7 Literatur

- Acuna-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Monti, M.G., Ortiz, G.G., and Reiter, R.J. (1997). Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 60, 23-29.
- Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Alkayed, N.J., Murphy, S.J., Traystman, R.J., and Hurn, P.D. (2000). Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 31, 161-168.
- Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Uria, H., Kotler, M.L., Rodriguez-Colunga, M.J., Tolivia, D., and Menendez-Palaez, A. (1996). Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 10, 882-890.
- Barsacchi, R., Kusmic, C., Damiani, E., Carloni, P., Greci, L., and Donato, L. (1998). Vitamin E consumption induced by oxidative stress in red blood cells is enhanced by melatonin and reduced by N-acetylserotonin. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1187-1192.
- Behan, W.M.H., McDonald, M., Darlington, L.G., and Stone, T.W. (1999). Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Brit. J. Pharmacol.* 128, 1754-1760.
- Behl, C (2002). Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Rev.* 3, 433-442.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., and Holsboer, F. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 51, 535-541.
- Behl, C., and Holsboer, F. (1999). The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends in Pharmacol. Sci.* 20, 441-444.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., and Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid protein toxicity. *Cell* 77, 817-827.
- Benitez-King, G., and Anton-Tay, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49, 635-641.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell. Res.* 211, 314-321.
- Beyer, C., and Raab, H. (1998). Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur. J. Neurosci.* 10, 255-262.
- Bhargava, V., Kell, D.L., van de Rijn, M., and Warnke, R.A. (1994). Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positively. *Am. J. Pathol.* 145, 535-540.
- Bi, R., Broutman, G., Foy, M.R., Thompson, R.F., and Baudry, M. (2000). The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3602-3607.
- Bicknell, R.J. (1998). Sex-steroid actions on neurotransmission. *Curr. Opin. Neurol.* 11, 667-671.
- Birge, S.J. (1996). Is there a role for estrogen replacement therapy in the prevention and treatment of dementia? *J. Am. Geriatr. Soc.* 44, 865-870.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartat or nitric oxide / superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7162-7166.
- Bonnefont, A.B., Munoz, F.J., and Inestrosa, N.C. (1998). Estrogen protects neuronal cells from the

- cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes. *FEBS Lett.* **441**, 220-224.
- Brewer, G.J. (1995). Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum and dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* **42**, 674-683.
- Brines, M.L., Gezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., and Cirami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10526-10531.
- Bruer, U., Weih, M.K., Isaev, N.K., Meisel, A., Ruscher, K., Bergk, A., Trendelenburg, G., Wiegand, F., Victorov, I.V., and Dirnagl, U. (1997). Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* **414**, 117-121.
- Brusco, I., Marquez, M., and Cardinali, D.P. (1998) Monozygotic twins with Alzheimer's disease treated with melatonin: case report. *J. Pineal Res.* **25**, 260-263.
- Brusco, I., Marquez, M., and Cardinali, D.P. (2000) Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms of Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.* **21**, 39-42.
- Busser, J., Geldmacher, D.S., and Herrup, K. (1998). Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci.* **18**, 2801-2807.
- Cardinali, D.P., Brusco, L.I., Liberczuk, C., and Furio, A.M. (2002) The use of melatonin in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.* **23 Suppl. 1**, 20-23.
- Cazevieuille, C., Safa, R., and Osborne, N.N. (1997). Melatonin protects primary neuronal cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia / reoxygenation. *Brain Res.* **768**, 120-124.
- Celik, M., Gökmen, N., Erbayraktar, S., Akhisaroglu, M., Konakç, S., Ulukus, C., Genc, S., Genc, K., Sagiroglu, E., Ceramil, A., and Brines, M. (2002). Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2258-2263.
- Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R.A., Zhu, R.L., Graham, S.H., and Simon, R.P. (1998). Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **18**, 4914-4928.
- Chen, S.T., and Chuang, J.I. (1999). The antioxidant melatonin reduces cortical neuronal death after intrastriatal injection of kainate in the rat. *Exp. Brain Res.* **124**, 241-247.
- Chen, Z.J., Yu, L., and Chang, C.H. (1998). Stimulation of membrane-bound guanylate cyclase activity by 17 β -estradiol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **252**, 639-642.
- Cho, S., Joh, T.H., Baik, H.W., Dibinis, C., and Volpe, B.T. (1997) Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* **755**, 335-338.
- Cohen, G., and Heikkila, R.E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* **249**, 2447-2452.
- Cohen, J.J. (1991). Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* **50**, 55-85.
- Copani, A., Bruno, V., Battaglia G., Leanza, G., Pellitteri, R., Russo, A., Stanzani, S., and Nicoletti, F. (1995). Activation of metabotropic glutamate receptor protects cultured neurons against apoptosis induced by β -amyloid peptide. *Mol. Pharmacol.* **47**, 890-897.
- Copin, J.C., Li, Y., Reola, L., and Chan P. H. (1998). Trolox and 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione prevent necrosis but not apoptosis in cultured neurons subjected to oxygen deprivation. *Brain Res.* **784**, 25-36.
- Costa, M.M., Reus, V.I., Wolkowitz, O.M., Manfredi, F., and Lieberman, M. (1999). Estrogen replacement therapy and cognitive decline in memory-impaired post-menopausal women. *Biol. Psychiatry.* **46**, 182-188.
- Dabbeni-Sala, F., Floreani, M., Franceschini, D., Skaper, S.D., and Giusti, P. (2001). Kainic acid in-

- duces selective mitochondrial oxidative phosphorylation enzyme dysfunction in cerebellar granule neurons: protective effects of melatonin and GSH ethyl ester. *FASEB J.* **15**, 1786-1788.
- Dawson, T.M. (2002). Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin. *Lancet* **359**, 96-97.
- Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.
- Digicaylioglu, M., and Lipton, S.A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature* **412**, 641-647.
- Dodel, R.C., Du, Y., Bales, K.R., Ling, Z., Carvey, P.M., and Paul, S.M. (1999). Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Mol. Brain Res.* **64**, 141-148.
- Dubal, D.B., Kashon, M.L., Pettigrew, L.C., Ren, J.M., Finklestein, S.P., Rau, S.W., and Wise, P.M. (1998). Estradiol protects against ischemic injury. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* **18**, 1253-1258.
- Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., and Wise, P.M. (1999). Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J. Neurosci.* **19**, 6385-6393.
- Dubal, D.B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Kindy, M.S., and Wise, P.M. (2001) Estrogen receptor α , not β , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1952-1957.
- Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Waeber, C., Zhang, L., Gómez-Isla, T., Hyman, B.T., and Moskowitz, M.A. (1998). Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **18**, 238-247.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, 663-698.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A., and Cocco, L. (1993). The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **193**, 19-25.
- Filipkowski, R.K., Hetman, M., Kaminska, B. and Kaczmarek, L. (1994). DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *NeuroReport* **5**, 1538-1540.
- Fink, K., Zhu, J., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Endres, M., Ma, J., Dalkara, T., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1998). Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **18**, 1071-1076.
- Fisher, A., Mantione, C.R., Abraham, D.J., and Hanin, I. (1982). Long-term central cholinergic hypofunction in mice by ethylcholine aziridinium ion (AF64A) in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **222**, 140-145.
- Floresani, M., Skaper, S.D., Facci, L., Lipartiti, M., and Giusti, P. (1997). Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *FASEB J.* **11**, 1309-1315.
- Garcia-Segura, L.M., Cardona-Gomez, P., Naftolin, F., and Chowen, J.A. (1998). Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *NeuroReport* **9**, 593-597.
- Gazzaley, A.H., Weiland, N.G., McEwen, B.S., and Morrison, J.H. (1996). Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **16**, 6830-6838.
- Gerschenson, L.E., and Rotello, R.J. (1992). Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J.* **6**, 2450-2455.
- Gibb, J.W., Bush, L., and Hanson G.R. (1997). Exacerbation of methamphetamine-induced neuro-

- chemical deficits by melatonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 630-635.
- Gilad, E., Wong, H.R., Zingarelli, B., Virág, L., O'Connor, M., Salzman, A.L., and Szabó, C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF κ B activation. *FASEB J.* **12**, 685-693.
- Giusti, P., Lipartiti, M., Franceschini, D., Schiavo, N., and Floreani, M. (1996). Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J.* **10**, 891-896.
- Glücksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59-86.
- Golstein, P., Ojcius, D.M., Young, J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* **121**, 29-65.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., and Mattson, M.P. (1996). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid β -peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **66**, 1836-1844.
- Gottron, F.J., Ying, H.S., and Choi, D.W. (1997). Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* **9**, 159-169.
- Gridley, K.E., Green, P.S., and Simpkins, J.W. (1997). Low concentration of estradiol reduce β -amyloid (25-35)-induced neurotoxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res.* **778**, 158-165.
- Grodstein, F., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Willet, W.C., Rosner, B., Speizer, F.E., and Hennekens, C.H. (1996). Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **335**, 453-461.
- Gschwind, M., and Huber, G. (1995). Apoptotic cell death induced by β -amyloid₁₋₄₂ is cell type dependent. *J. Neurochem.* **65**, 292-300.
- Gu, Q., Korach, K.S., and Moss, R.L. (1999). Rapid action of 17 β -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* **140**, 660-666.
- Gulyaeva, N.V., Lazareva, N.A., Libe, M.L., Mitrokhina, M.V., Yu, M., and Walsh, T.J. (1996). Oxidative stress in the brain following intraventricular administration of ethylcholine aziridinium (AF64A). *Brain Res.* **726**, 174-180.
- Hanin, I. (1996). The AF64A model of cholinergic hypofunction: An update. *Life Sci.* **58**, 1955-1964.
- Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Freyer, D., Weih, M., Dirnagl, U., Weber, J.R., and Hörtnagl, H. (2000). Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. *FASEB J.* **14**, 1814-1824.
- Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Katchanov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Megow, D., Dirnagl, U., Weber, J.R., and Hörtnagl, H. (2001). Differential mechanisms of neuroprotection by 17 β -Estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J. Neurosci.* **21** (8), 2600-2609.
- Harms, C. & Katchanov, J., Hauck, L., Herwig, U., Freyer, D., Engel, F., v. Harsdorf, R., Bhide, B.G., Dirnagl, U., Hörtnagl, H., and Endres, M. (2002). Temporal coordination in the progression of neurons into G1/S-phase and onset of delayed neuronal apoptosis. Manuscript submitted.
- Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Div.* **4**, 581-586.
- Hogervorst, E., and Smith, D. (2002). The interaction of serum folate and estradiol levels in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.* **23**, 155-160.
- Honda, K., Sawada, H., Kihara, T., Urushitani, M., Nakamizo, T., Akaike, A., and Shimohama, S. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* **60**, 321-327.

- Hörtnagl, H., Berger, M.L., Reither, H., and Hornykiewicz, O. (1991). Cholinergic deficit induced by ethylcholine aziridinium (AF64A) in rat hippocampus: Effect on glutamatergic systems. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344, 213-219.
- Huerto-Delgadillo, L., Anton-Tay, F., and Benitez-King, G. (1994). Effects of melatonin in microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 17, 55-62.
- Hurn, P.D., and MacRae, I.M. (2000). Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 20, 631-652.
- Hyder, S.M., Chiappetta, C., and Stancel, G.M. (1999). Interaction of human estrogen receptors α and β with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochem. Pharmacol.* 57, 597-601.
- Iacovitti, L., Stull, N.D., and Johnston, K. (1997). Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res.* 768, 317-326.
- Ianas, O., Olinescu, R. and Badescu, I. (1991). Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinology* 29, 147-153.
- Jin, B.K., Shin, D.Y., Jeong, M.Y., Gwag, M.R., Baik, H.W., Yoon, K.S., Cho, Y.H., Joo, W.S., Kim, Y.S., and Baik, H.H. (1998). Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats. *Neurosci. Lett.* 245, 61-64.
- Kabuto, H., Yokoi, I., and Ogawa, N. (1998). Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsia* 39, 237-243.
- Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., and Grohé, C. (2000). Estrogen receptor α rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 18447-18453.
- Katchanov, J. & Harms, C., Gertz, K., Hauck, L., Waeber, C., Hirt, L., Priller, J., v. Harsdorf, R., Brück, W., Hörtnagl, H., Dirnagl, U., Bhide, P.G., and Endres, M. (2001). Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J. Neurosci.* 21, 5045-5053.
- Keller, J.N., Germeyer, A., Begley, J.G., and Mattson, M.P. (1997). 17 β -Estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid β -peptide and iron. *J. Neurosci. Res.* 50, 522-530.
- Kerr, J.F.R. (1971). Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105, 13-20.
- Kerr, J.F.R., and Harmon, B.V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: Tomei, L.D., and Cope, F.O., eds. *Apoptosis: The molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3, 5-29.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kim, Y.S., Joo, W.S., Jin, B., Cho, Y.H., Baik, H.H., and Park, C.W. (1998). Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *NeuroReport* 9, 2387-2390.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., and Hoffmann, G.F. (2001). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatric Res.* 50, 76-82.
- Koh, J.Y., and Choi D.W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Meth.* 20, 83-90.
- Koh, J.Y., Wie, M.B., Gwag, B.J., Seni, S.L., Canzoniero, L.M., Demaro, J., Csernansky, C., and Choi, D.W. (1995). Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp. Neurol.* 135, 153-159.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., and Williams L.T. (1997). Caspase-3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.

- Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138, 863-870.
- Kuiper, G.G.J.M., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., and Gustafsson, J.-A. (1998). The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 19, 253-286.
- Lafferty, F.W., and Fiske, M.E. (1994). Postmenopausal estrogen replacement: a long term cohort study. *Am. J. Med.* 97, 66-77.
- Laflamme, N., Nappi, R.E., Drolet, G., Labrie, C., and Rivest, S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J. Neurobiol.* 36, 357-378.
- Lapin, I.P., Mirzaev, S.M., Ryzov, I.V., and Oxenkrug, G.F. (1998). Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylenetetrazole in mice. *J. Pineal Res.* 24, 215-218.
- Lassmann, H., Bancher, C., Breitkopf, H., Wegiel, J., Bobinski, M., Jellinger, K., and Wisniewski, H.M. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropath.* 89, 35-41.
- Lautenschlager, M., Arnschwald, A., Freyer, D., Weber, J. R., and Hörtnagl, H. (1997). The AF64A model of cholinergic hypofunction: Role of nitric oxide in AF64A-mediated neurodegeneration. In: *Advances in Behavioral Biology Vol 49: Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases* (Fisher, A., Yoshida, M., and Hanin, I., eds) pp. 681-686, Plenum Publishing Corporation, New York, USA
- Lautenschlager, M., Onufriev, M.V., Gulyaeva, N.V., Harms, C., Freyer, D., Sehmsdorf, U.-S., Ruscher, K., Moiseeva, Y.V., Arnschwald, A., Victorov, I., Dirnagl, U., Weber, J.R., and Hörtnagl, H. (2000). Role of nitric oxide in the ethylcholine aziridinium (AF64A) model of delayed apoptotic neurodegeneration in vivo and in vitro. *Neuroscience* 97, 383-393.
- Lee, S.J., and McEwen, B.S. (2001). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 569-591.
- Leist, M., and Jäätelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev.* 2, 3-10.
- Lezoualc'h, F., Skutella, T., Widmann, M., and Behl, C. (1996). Melatonin prevents oxidative stress-induced cell death in hippocampal cells. *NeuroReport* 7, 2071-2077.
- Linnik, M.D., Zobrist, R.H., and Hatfield, M.D. (1993). Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24, 2002-2008.
- Lotharius, J., Dugan, L.L., and O'Malley, K.L. (1999). Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 19, 1284-1293.
- MacManus, J.P., Buchan, A.M., Hill, I.E., Rasquinha, I., and Preston, E. (1993). Global ischemia can cause DNA fragmentation in rat brain. *Neurosci. Lett.* 164, 89-92.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15.
- Manev, H., Uz, T., Kharlamov, A., and Joo, J.-Y. (1996). Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J.* 10, 1546-1551.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., and Portera-Cailliau, C. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bulletin* 46 (4), 281-309.
- Mattson, M.P., Robinson, N., and Guo, Q. (1997). Estrogens stabilize mitochondrial function and protect neural cells against the pro-apoptotic action of mutant presenilin-1. *NeuroReport* 8, 3817-3821.

- Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., and Rodriguez, C. (1999). Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell damage. *Brain Res.* **818**, 221-227.
- Mechoulam, R., Panikashvili, D., and Shohami, E. (2002). Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* **8**, 58-61.
- Medina-Navarro, R., Duran-Reyes, G., and Hicks, J.J. (1999). Pro-oxidating properties of melatonin in the in vitro interaction with the singlet oxygen. *Endocr. Res.* **25**, 263-280.
- Mehmet, H. (2000) Caspases find a new place to hide. *Nature* **403**, 29-30.
- Melchiorri, D., Reiter, R.J., Sewerynek, E., Chen, L.D., and Nistico, G. (1995). Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *FASEB J.* **9**, 1205-1210.
- Mermelstein, P.G., Becker, J.B., and Surmeier, D.J. (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.* **16**, 595-604.
- Mevissen, M., and Ebert, U. (1998). Anticonvulsant effects of melatonin in amygdala-kindled rats. *Neurosci. Lett.* **257**, 13-16.
- Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H., and Mizuno, Y (1996). Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **137**, 120-123.
- Mohan, N., Sadeghi, K., Reiter, R.J., and Meltz, M.L. (1995). The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF- κ B. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **37**, 1063-1070.
- Mook-Jung, I., Joo, I., Sohn, S., Kwon, H.J., Huh, K., and Jung, M.W. (1997). Estrogen blocks neurotoxic effects of β -amyloid (1-42) and induces neurite extension on B103 cells. *Neurosci. Lett.* **235**, 101-104.
- Moosmann, B., and Behl, C. (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **96**, 8867-8872.
- Mulnard, R.A., Cotman, C.W., Kawas, C., van Dyck, C.H., Sano, M., Doody, R., Koss, E., Pfeiffer, E., Jin, S., Gamst, A., Grundman, M., Thomas, R., and Thal, L.J. (2000). Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. A randomized controlled trial. *JAMA* **283**, 1007-1015.
- Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *JCB* **150**, 887-894.
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **18**, 3659-3668.
- Nath, R., Raser, K.J., Stafford, D., Hajimohammadreza, I., Posener, A., Allen, H., Talanian, R.V., Yuen, P., Gilbertsen, R.B., and Wang, K.K. (1996). Non-erythroid α -spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 β -converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* **319**, 683-690.
- Nathan, L., and Chaudhuri, G. (1998). Antioxidant and prooxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **16**, 309-314.
- Nicotera, P., Leist, M., and Manzo, L. (1999). Neuronal cell death: A demise with different shapes. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 46-51.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickmann, J.A., Wakeling, A.F., Walker, P.R., and Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **12**, 3679-3684.
- Oppenheim, R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system.

Annu. Rev. Neurosci. 14, 453-501.

- Osuga, H., Osuga, S., Wang, F., Hogan, M.J., Slack, R.S., Hakim, A.M., Ikeda, J.-E., and Park, D.S. (2000). Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10254-10259.
- Otsuki, Y., Misaki, O., Sugimoto, O., Ito, Y., Tsujimoto, Y., and Akao Y (1994). Cyclic bcl-gene expression in humane uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 344, 28-29.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G.J.M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 277, 1508-1510.
- Paganini-Hill, A., and Henderson, V.W. (1994). Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am. J. Epidemiol.* 140, 256-261.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanuš, L., Breuer, A., Mechoulam, R., and Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413, 527-531.
- Paolini, M., Pozzetti, L., Pedulli, G.F., Marchesi, E., and Cantelli-Forti, G. (1999). The nature of pro-oxidant activity of vitamin C. *Life Sci.* 64, 273-278.
- Pappolla, M.A., Sos, M., Omar, R.A., Blick, R.J., Hickson-Blick, D.L.M., Reiter, R.J., Efthimiopoulos, S., and Robakis, N.K. (1997). Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J. Neurosci.* 17, 1683-1690.
- Pappolla, M., Bozner, P., Soto, C., Shao, H., Robakis, N.K., Zagorski, M., Frangione, B., and Ghiso, J. (1998). Inhibition of Alzheimer β -fibrillogenesis by melatonin. *J. Biol. Chem.* 273, 7185-7188.
- Park, D.S., Farinelli, S.E., and Greene, L.A. (1996). Inhibitors of cyclin-dependent kinases promotes survival of postmitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 271, 8161-8169.
- Park, D.S., Levine, B., Ferrari, G., and Greene, L.A. (1997). Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 17, 8975-8983.
- Park, D.S., Morris, E.J., Padmanabhan, J., Shelanski, M.L., Geller, H.M., and Greene, L.A. (1998). Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J. Cell Biol.* 143, 457-467.
- Pike, C.J. (1999). Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and β -amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 72, 1552-1563.
- Pollard, H., Charriaut-Marlangue, C., Cantagrel, S., Represa, A., Robain, O., Moreau, J. and Ben-Ari, Y. (1994). Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63, 7-18.
- Raff, M.C., Barres, B., Burne, J., Coles, H., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. (1993). Programmed cell death and control of cell survival: Lessons from the central nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to cell death programm. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* 276, 33869-33874.
- Regan, R.F., and Guo, Y. (1997). Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin, chemical hypoxia, and excitatory amino acids in murine cortical cultures. *Brain Res.* 764, 133-140.
- Reiter, R.J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526-533.
- Reiter, R.J., Tang, L., Garcia, J.J., and Munoz-Hoyos, A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60, 2255-2271.

- Reiter, R.J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* **56**, 359-384.
- Rinner, W.A., Piffl, C., Lassmann, H., and Hörtnagl, H. (1997). The induction of apoptosis in vitro and in vivo by the cholinergic neurotoxin ethylcholine aziridinium. *Neuroscience* **79**, 535-542.
- Robinson, D., Friedman, L., Marcus, R., Tinklenberg, J., and Yesavage, J. (1994). Estrogen replacement therapy and memory in older women. *J. Am. Geriatr. Soc.* **42**, 919-922.
- Sakanaka M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4635-4640.
- Sampei, K., Goto, S., Alkayed, N.J., Crain, B.J., Korach, K.S., Traystman, R.J., Demas, G.E., Nelson, R.J., and Hurn, P.D. (2000). Stroke in estrogen receptor- α -deficient mice. *Stroke* **31**, 738-744.
- Saunders-Pullman, R., Gordon-Elliott, J., Parides, M., Fahn, S., Saunders, H.R., and Bressman, S. (1999). The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology* **52**, 1417-1421.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* **14**, 131-136.
- Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., and Shimohama, S. (1998). Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J. Neurosci. Res.* **54**, 707-719.
- Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., and Shimohama, S. (2000). Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J.* **14**, 1202-1214.
- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E.E., and Osborne, B.A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 980-984.
- Sheldon, S.H. (1999). Pro-convulsant effects of oral melatonin in neurologically disabled children. *Lancet* **351**, 1254.
- Sherwin, B.B. (1994). Estrogenic effects on memory in women. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **743**, 213-230.
- Shi, J., Panickar, K.S., Yang, S.H., Rabbani, O., Day, A.L., and Simpkins, J.W. (1998). Estrogen attenuates over-expression of β -amyloid precursor protein messenger RNA in an animal model of focal ischemia. *Brain Res.* **810**, 87-92.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., and Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **388**, 507-525.
- Singer, C.A., Rogers, K.L., Strickland, T.M., and Dorsa, D.M. (1996). Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci. Lett.* **212**, 13-16.
- Singer, C.A., Figueroa-Masot, X.A., Batchelor, R.H., and Dorsa, D.M. (1999). The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**, 2455-2463.
- Skaper, S.D., Ancona, B., Facci, L., Franceschini, D., and Giusti, P. (1998). Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB J.* **12**, 725-731.
- Slee E.A., Adrain, C., and Martin S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 7320-7326.
- Southgate, G.S., Daya, S., and Potgieter, B. (1998). Melatonin plays a protective role in quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *J. Chem. Neuroanat.* **14**, 151-156.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W.B., Kim, S.J., and Elsokkary, G.H. (1998). Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice. *J. Neurosci. Res.* **54**, 382-389.

- Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., and Mayeux, R. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429-432.
- Teixeira, C., Reed, J.C., and Pratt, M.A. (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 55, 3902-3907.
- Thompson, C.G. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Tieu, K., Zuo, D.M., and Yu, P.H. (1999). Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J. Neurosci. Res.* 58, 426-435.
- Tsubata, T., Murakami, M., Nisitani, S., and Honjo, T. (1994). Molecular mechanisms for B lymphocyte selection: Induction and regulation of antigen-receptor-mediated apoptosis of mature B cells in normal mice and their defect in autoimmunity-prone mice. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 345, 297-301.
- Uz, T., Giusti, P., Franceschini, D., Kharlamov, A., and Manev, H. (1996). Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. *Neuroscience* 73, 631-636.
- Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H., and Orrenius, S. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 31075-31085.
- Vaux, D.L., Haecker, G., and Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-779.
- Virchow, R. (1858). Cellular pathology based upon physiological and pathological histology. London: Curchill.
- Walker, P.R., Kokileva, L., LeBlanc, J., and Sikorska, M. (1993). Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 15, 1032-1040.
- Wang, K.K.W. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23, 20-26.
- Weaver, C.E. Jr., Park-Chung, M., Gibbs, T.T., and Farb, D.H. (1997). 17 β -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* 761, 338-341.
- Wiesner, D.A., and Dawson, G. (1996). Staurosporine induces programmed cell death in embryonic neurons and activation of the ceramide pathway. *J. Neurochem.* 66, 1418-1425.
- Williams, G.T. (1991). Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65, 1097-1098.
- Wong, S.H.Y., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N. Jr., and Sunderman, F.W. Jr. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatography separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* 33, 214-220.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Xu, H., Gouras, G.K., Greenfield, J.P., Vincent, B., Naslund, J., Mazzarelli, L., Fried, G., Jovanovic, J.N., Seeger, M., Relkin, N.R., Liao, F., Checler, F., Buxbaum, J.D., Chait, B.T., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., Wang, R., Greengard, P., and Gandy, S. (1998). Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nat. Med.* 4, 447-451.
- Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I., and Grady, D. (1998). Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 279, 688-695.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001) Activation of caspase 12, an endoplasmic reticulum (RE) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276, 13935-13940.

- Zaulyanov, L.L., Green, P.S., Simpkins, J.W. (1999). Glutamate requirement for neuronal death from anoxia-reoxygenation: an in vitro model for assessment of the neuroprotective effects of estrogens. *Cell. Mol. Neurobiol.* *19*, 705-718.
- Zhang, L., Chang, Y.H., Barker, J.L., Hu, Q., Zhang, L., Maric, D., Li, B.S., and Rubinow, D.R. (2000). Testosterone and estrogen affect neuronal differentiation but not proliferation in early embryonic cortex of the rat: the possible roles of androgen and estrogen receptors. *Neurosci. Lett.* *281*, 57-60.
- Zheng, H., Xu, H., Uljon, S.N., Gross, R., Hardy, K., Gaynor, J., Lafrancois, J., Simpkins, J., Refolo, L.M., Petanceska, S., Whang, R., and Duff, K. (2002). Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. *J. Neurochem.* *80*, 191-196.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF64A	Ethylcholin-Aziridinium
DIV	<i>days in vitro</i> , Zellkultivierungszeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTU	Dimethylthiourea
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i> , Astrozytenmarker
ICI 182,780	Estrogenrezeptorantagonist
IE	Internationale Einheiten
IGF1	<i>insulin-like growth factor-1</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1-Rezeptorweg
PI3-Kinase	Phospho-Inositol-3-Kinase
LDH	Laktatdehydrogenase
LY294002	Hemmer der Phospho-Inositol-3-Kinase
MK801	Blocker des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors
MTT	Thiazolylblau (Tetrazoliumsalm)
NBM	Neurobasales Medium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OGD	<i>oxygen-glucose deprivation</i> , Sauerstoff-Glukose-Entzug
6-OH-DA	6-Hydroxydopamin
PBN	<i>N-tert</i> -Butyl- α -Phenylnitron
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> , Na-Dodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Zusatz von Tween 20
TUNEL-Färbung	Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase-mediertes dUTP Nick-End Labeling
Z-VAD-FMK	Caspaseinhibitor, gekoppelt an Fluoromethylketon

Danksagung

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. H. Hörtnagl bin ich zu besonderem Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas und die liebevolle und geduldige Betreuung meiner Arbeit verpflichtet. In vielfacher Weise war die Zeit wissenschaftlicher Arbeit unter ihrer Anleitung für mich eine große Bereicherung.

Herrn Prof. Dr. K. M. Einhäupl und insbesondere Herrn Prof. Dr. J. W. Weber gilt mein Dank für die Unterstützung der wissenschaftlichen Arbeit an der Klinik für Neurologie. Herrn Prof. Dr. U. Dirnagl danke ich für die Möglichkeit in den Laboren des Instituts für Experimentelle Neurologie arbeiten zu dürfen und den wissenschaftliche Austausch in lebhaften und kritischen Diskussionen. Die enge Kooperation mit den verschiedenen Arbeitsgruppen dieser Einrichtungen waren für mich sehr wertvoll und hilfreich, namentlich möchte ich Frau Dr. Freyer und Frau R. Gusinda danken.

Marion Lautenschlager danke ich für die kompetente Einarbeitung in verschiedene Labortechniken insbesondere in die Methodik der primären neuronalen Zellkulturen.

Frau Hannelore Glatte danke ich für die hervorragende technische Unterstützung bei der Erstellung der Graphiken für die Publikationen, Frau Astrid Arnswald für die umsichtige und erfahrene logistische Unterstützung und Frau Brigitte Drüge für das Korrekturlesen der Dissertation.

Der Medizinischen Fakultät Charité danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Forschungssemester. Dem akademischen Auslandsamt der Humboldt-Universität danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Präsentation von Teilen meiner Arbeit im Ausland.

Meiner Familie bin ich besonders für ihre Unterstützung, Liebe und Geduld in meiner Ausbildungszeit dankbar. Nie wurde ich in meiner Freiheit in irgendeiner Form eingeschränkt und hatte die Möglichkeit, meinen Ideen kreativ nachzugehen.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner geliebten Ulrike, Richard Jonathan und meiner grossen Familie.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das verwendete Schrifttum vollständig erwähnt habe, die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die vorliegende Dissertationsschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Berlin, den 20.10.2002